

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA  
MOLECULAR

ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE PROTEÍNAS  
DE MOVIMIENTO VIRAL DE VIRUS DE PLANTAS

LUIS MARTÍNEZ GIL

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 13 de febrer de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Vicente Rubio Zamora
- Dr. Juan Antonio García Álvarez
- Dr. José Luis Nieva Escandón
- Dr. Fernando Aniento Company
- Dr. Jesús Salgado Benito

Va ser dirigida per:

Dr. Ismael Mingarro Muñoz

©Copyright: Servei de Publicacions  
Luis Martínez Gil

---

Dipòsit legal: V-3755-2009

I.S.B.N.: 978-84-370-7511-2

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Arts Gràfiques, 13 baix  
46010 València  
Spain  
Telèfon:(0034)963864115

# Estudio estructural y funcional de proteínas de movimiento viral de virus de plantas

Luis Martínez Gil  
2009

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por  
la Universitat de València

El Dr. Ismael Mingarro Muñoz, Profesor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València,

Certifica que: Don Luis Martinez Gil, Licenciado en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título: "Estudio estructural y funcional de proteínas de movimiento viral de virus de plantas" presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste y produzca los efectos oportunos donde proceda, firmo la presente acreditación en Burjassot a 12 enero 2009

Dr. Ismael Mingarro

A mis padres

Muchas gracias a todos los que habéis participado de forma directa o indirecta en esta tesis. Especialmente a Ismael, Jesús, Cucha, Ana Saurí, Ana J., Dunja, Santi, Gustavo, Silvia, Maria, Cristina y Marçal.

ABREVIATURAS	i, ii
INTRODUCCIÓN	3
I.1 La célula vegetal	4
i.1.1 Organización básica de la célula vegetal	4
i.1.2 Los plasmodesmos	7
I.2 Movimiento de los virus de plantas	9
i.2.1 Entrada del virus a la célula vegetal	10
i.2.2 Desensamblaje de la cubierta viral	11
i.2.3 Replicación y traducción del genoma viral	11
i.2.4 Movimiento célula-célula	13
i.2.5 Transporte sistémico	16
i.2.6 Regulación del movimiento	16
I.3 Las proteínas de movimiento viral	17
i.3.1 Clasificación de las proteínas de movimiento viral	18
I.4 Respuesta de la planta a la infección viral	20
I.5 Organización genómica de los virus estudiados en la presente tesis	21
i.5.1 Virus de las manchas necróticas del melón (MNSV)	21
i.5.2 Virus del arrugamiento del nabo (TCV)	22
i.5.3 Virus de los anillos necróticos del prunero (PNRSV)	23
i.5.4 Virus del mosaico del tabaco (TMV)	24
I.6 Las membranas biológicas	27
i.6.1 Componente lipídico	27
i.6.2 Componente proteico	32
I.7 Plegamiento y estabilidad de proteínas helicoidales de membrana	33
i.7.1 El modelo de dos estados	34
i.7.2 Requisitos para la inserción de un dominio helicoidal en la membrana	37
I.8 Inserción de proteínas de membrana	39
i.8.1 Translocación co-traducciona	41
i.8.2 Translocación post-traducciona	43
i.8.3 Inserción de proteínas en la membrana del ER	46
i.8.4 Anclaje a la membrana a través del extremo C-t	47
i.8.5 Componentes del translocón	48
i.8.6 Translocación en mitocondrias	50
i.8.7 Translocación en cloroplastos	50
i.8.8 Translocación en bacterias	51
I.9 Topogénesis de proteínas de membrana	52

i.9.1 Clasificación de proteínas integrales de membrana según su topología	52
i.9.2 Determinantes topológicos	52
I.10 Direccionamiento de proteínas de membrana	54
 APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL	 59
Ex.1 Identificación de dominios transmembrana	59
ex.1.1 Predicción de fragmentos transmembrana	59
ex.1.2 Mapeo por glicosilación	63
Ex.2 Determinación del grado de asociación a membranas	66
ex.2.1 Sedimentación de membranas	66
ex.2.2 Reparto de fases con Triton X-114	67
ex.2.3 Flotación de membranas	67
Ex.3 Determinación de la topología de una proteína de membrana	68
ex.3.1 Determinación de la topología mediante modificación por glicosilación	68
ex.3.2 Determinación de la topología mediante digestión con proteasas	69
ex.3.3 Determinación de la topología mediante marcaje específico de cisteínas	70
ex.3.4 Determinación de la topología de proteínas de membrana en células de <i>E. coli</i> empleando la proteína de fluorescencia verde	70
Ex.4 Dicroísmo circular	72
Ex5. Comportamiento interfacial de péptidos hidrofóbicos	77
ex.5.1 Tensión superficial	77
ex.5.2 Monocapas proteicas	78
ex.5.3 Inserción de péptidos en monocapas lipídicas preformadas	78
ex.5.4 Isotermas péptido/lípido	79
Ex.6 Liberación de contenidos	80
Ex.7 Ensayo <i>in vivo</i> de la capacidad de transporte de la MP del PNRSV	81
 OBJETIVOS	 85



RESULTADOS	89
R.1 Asociación y topología de la proteína de movimiento p7B del MNSV en membranas del ER	90
r.1.1 Análisis de la secuencia de p7B del virus de las manchas necróticas del melón	90
r.1.2 p7B es una proteína integral de membrana	91
r.1.3 Inserción del fragmento TM de p7B en membranas biológicas	93
r.1.4 p7B se inserta de forma co-traducciona en membranas del ER con una topología N-t citoplasmático/C-t luminal	93
r.1.5 Efecto de la presencia de p7A en la topología de p7B	99
r.1.6 Inserción y topología en microsomas de p14	101
r.1.7 Topología de p7B en membranas de <i>E.coli</i>	102
r.1.8 Discusión	107
R.2 Asociación y topología de la proteína de movimiento p9 del TCV en membranas del ER	111
r.2.1 Análisis de la secuencia de p9	111
r.2.2 Inserción en membranas biológicas de las HR1 y HR2 de p9	112
r.2.3 Inserción y topología en membranas microsomales de la proteína de movimiento p9 del TCV	113
r.2.4 Inserción y direccionamiento a membranas de la HR1 de p9	116
r.2.5 Mecanismo de inserción en membranas de p9	118
r.2.6 Discusión	119
R.3 Asociación a membranas de la MP p32 del PNRSV	123
r.3.1 Análisis de la secuencia de la MP del PNRSV	123
r.3.2 Inserción de la región hidrofóbica de p32 en el contexto de una proteína modelo	125
r.3.3 La proteína de movimiento del PNRSV no es una proteína integral de membrana	127
r.3.4 p32 se asocia a las membranas de forma periférica	130
r.3.5 Determinación del efecto de los cambios Pro96Ala y Gln99Leu en la estructura secundaria de la HR de p32	132
r.3.6 Dicroísmo circular	133
r.3.7 Disposición en interfases aire/agua	134

r.3.8 Liberación de contenidos	139
r.3.9 Requerimiento de la HR en el movimiento célula-célula de PNRSV	140
r.3.10 Discusión	142
R.4 Asociación a membranas de la MP p30 del TMV	147
r.4.1 Análisis de la secuencia de la proteína de movimiento de TMV	148
r.4.2 Inserción de los putativos dominios TM en membranas derivadas del retículo endoplasmático	149
r.4.3 p30 del Virus del Mosaico del Tabaco no es una proteína integral de membrana	154
r.4.4 Asociación de p30 a membranas microsomales	156
r.4.5 Discusión	157
R.5 Discusión general: Análisis global de la interacción entre las MPs virales y la membrana	161
CONCLUSIONES	169
MATERIALES Y MÉTODOS	173
M.1 Material biológico	173
m.1.1 Manipulación de <i>Escherichia coli</i>	173
m.1.2 Manipulación de <i>Nicotiana tabaccum</i>	175
M.2 Manipulación y aislamiento de DNA	175
m.2.1 Aislamiento de DNA plasmídico	175
m.2.2 Secuenciación de DNA	175
m.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	176
m.2.4 Reacciones de mutagénesis dirigida	176
m.2.5 Digestiones y ligaciones de DNA	177
m.2.6 Vectores utilizados y diseño de construcciones	177
m.2.7 Mutantes utilizados	179
M.3 Transcripción y traducción <i>in vitro</i>	181
m.3.1 Transcripción <i>in vitro</i>	181
m.3.2 Traducción <i>in vitro</i>	182
m.3.3 Sedimentación de membranas, tratamiento con Urea, extracción Alcalina y particionamiento con Triton X-114	183
m.3.4 Tratamiento con Proteinasa K	184
m.3.5 Deglicosilación con Endoglicosidasa H	185

m.3.6 Marcaje específico de de cisteínas	185
M.4 Ensayo topológico basado en la GFP	186
M.5 Análisis informático de las secuencias virales	186
M.6 Síntesis química en fase sólida y purificación de péptidos	187
M.7 Dicroísmo circular	187
M.8 Inserción de péptidos en monocapas lipídicas	188
M.9 Electroforesis de proteínas	188
M.10 Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUVs)	189
BIBLIOGRAFÍA	193

## **ABREVIATURAS**

**AMS:** sal disódica del ácido 2,2'disulfónico 4-acetamido-4'maleimidilestilbeno

**ANTS:** 8-aminonaftaleno-1,3,6 ácido trisulfónico

**CarMV:** Virus del moteado del clavel

**C-t:** Carboxilo terminal

**DPX:** p-xileno-bis-bromidio de piridinio

**ER:** Retículo endoplasmático

**MAL-PEG:** Maleimida-metoxi polietileno-glicol

**MMs:** Membranas microsomales

**MNSV:** Virus de las manchas necróticas del melón

**MP/MPs:** Proteína de movimiento/Proteínas de movimiento

**mRNA:** RNA mensajero

**N-t:** Amino terminal

**ORF:** Pauta de lectura abierta

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PD/PDs:** Plasmodios/s

**PNRSV:** Virus de los anillos necróticos de los pruneros

**POPC:** Palmitoil-oleoil-fosfatidil colina

**POPG:** Palmitoil-oleoil-fosfatidil glicerol

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**SDS-PAGE:** Electroforesis en geles de poli-acrilamida en presencia de SDS

**SEL:** Tamaño límite de exclusión molecular del PD

**sgRNA:** RNA sub-genómico

**SR:** Receptor de la SRP

**SRP:** Partícula de reconocimiento de la secuencia señal

**TCV:** Virus del arrugamiento del nabo

**TM:** Transmembrana

**TMV:** Virus del mosaico del tabaco

**tRNA:** RNA de transferencia

**vRNA:** RNA viral

# INTRODUCCIÓN

La palabra virus procedente del latín *virus-i* podría traducirse por veneno o toxina. El término se empleó por primera vez en el ámbito de la biología, en 1728, haciendo referencia al agente causante de una infección contagiosa. Aunque no fue hasta 1892 cuando Dimitri Ivanovski empleando un filtro, diseñado años antes por Charles Chamberland, que impedía el paso de bacterias, identificó el virus del mosaico del tabaco.

Los virus son parásitos intracelulares obligados, incapaces de completar su ciclo vital fuera de la célula hospedadora. Necesitan, dada su condición, emplear la maquinaria celular para llevar a cabo las funciones codificadas por su genoma, llegando en algunos casos a comprometer la supervivencia del propio huésped. Los virus, capaces de colonizar todos los reinos, presentan una enorme diversidad, a pesar de ello todos comparten unas características comunes que los colocan en la frontera de la vida. (1) Los virus poseen un genoma pequeño y compacto. El tamaño de los genomas virales varía entre 3200 nucleótidos y 1.2 millones de pares de bases. Debido a esta capacidad limitada para almacenar información y con objeto de maximizar el número de genes codificantes los virus han desarrollado múltiples estrategias para compactar su información genética; entre las que cabe destacar, el solapamiento de pautas de lectura, la organización multipartita de su genoma, la síntesis de RNAs subgenómicos, el procesamiento proteolítico de poliproteínas, los orígenes de traducción alternativos o el salto de codones de parada (*readthrough*). (2) La alta velocidad de replicación y la elevada tasa de mutación, derivada de la baja fidelidad de copia de las enzimas implicadas en la replicación de los genomas virales, junto a la fuerte presión selectiva a la que éstos están sometidos otorga a los virus una elevada tasa de evolución, y una elevada variabilidad genética. Característica que dificulta la defensa del huésped frente al patógeno (Holland, 2006). (3) Todos los virus presentan una organización estructural similar. Además del genoma viral, el cual puede ser DNA o RNA, ambos de simple o doble cadena, el virus presenta una cubierta proteica conocida como cápside (de estructura esférica o helicoidal). En algunos casos la cápside se encuentra rodeada por una envuelta de naturaleza lipídica, derivada de la membrana plasmática del huésped.

A lo largo de la historia los virus se han clasificado de múltiples maneras atendiendo a diferentes factores como el huésped al que infectan o la estructura de la cápside entre otros parámetros. La clasificación actualmente más extendida es la que hace referencia a la naturaleza del

## Introducción

genoma viral, clasificación propuesta por David Baltimore (premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1975). En ella diferenciamos ocho grupos dentro de los cuales se engloban aproximadamente 80 familias y 4000 especies.

### Virus de DNA

Grupo I (dsDNA) Virus de DNA de doble cadena.

Grupo II (ssDNA) Virus con DNA de cadena sencilla.

### Virus de RNA

Grupo III (dsRNA) Virus de RNA de doble cadena

Grupo IV (ssRNA+) Virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. Su genoma tiene naturaleza de mRNA y puede ser traducido a proteína directamente.

Grupo V (ssRNA-) Virus con RNA de cadena sencilla y polaridad negativa.

Grupo VI (ssRNA+-) Virus con regiones de polaridad negativa y positiva.

### Virus de DNA o RNA con transcripción reversa

Grupo VII (ssRNA-RT) Con cadena simple de RNA

Grupo VIII (dsDNA-RT) Presentan doble cadena de DNA

Esta clasificación no representa necesariamente una relación filogenética.

El ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) ha propuesto otra clasificación, similar al estándar tradicional de clasificación de organismos, en la que encontramos 5 grandes ordenes: Caudovirales, Herpesvirales, Mononegavirales, Nidovirales y Picornavirales; aunque existe un gran número de virus que aún no han sido clasificados atendiendo a estas reglas.

## I.1 LA CÉLULA VEGETAL

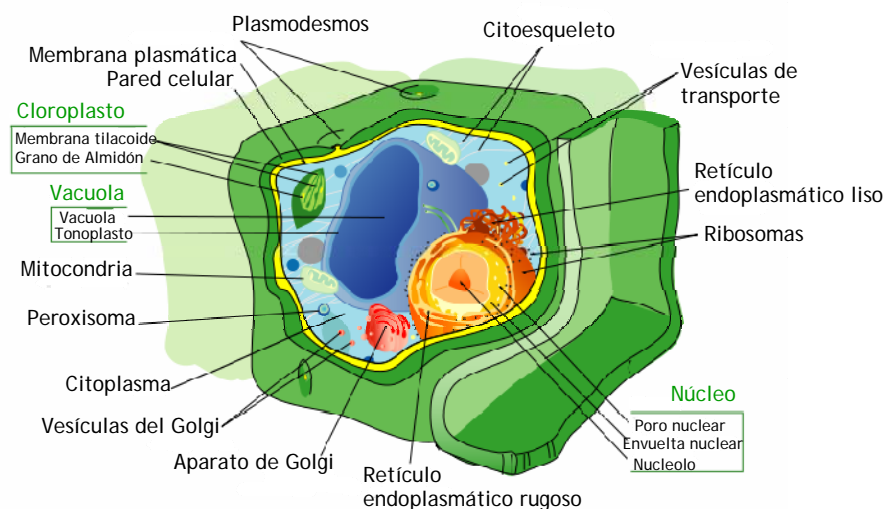
### i.1.1 Organización básica de una célula vegetal

Las células vegetales representan el espacio donde los virus de plantas desarrollan su ciclo vital. Más allá de las características comunes de las células eucariontes, las células vegetales presentan unas particularidades que las diferencian (figura i.1).



Los **cloroplastos** representan la fuente energética de la célula vegetal. Son capaces de almacenar la energía electromagnética derivada de la luz solar en forma de energía química, para después fijar CO<sub>2</sub> atmosférico.

**Vacuolas.** Almacén de agua, iones, sales y otras sustancias incluyendo subproductos tóxicos. Más allá del almacenamiento su principal función es mantener la turgencia de la célula. El volumen que ocupa la vacuola está controlado por canales de agua situados en la membrana de la vacuola. Las vacuolas también están implicadas en el control del pH celular, almacenamiento de pigmentos en flores y frutos y en la estructuración de los diferentes orgánulos celulares.



**Figura i.1. La célula vegetal.** Representación esquemática de los principales orgánulos que constituyen una célula vegetal, incluyendo aquellos que las diferencian de las células animales como: cloroplasto, vacuola, pared celular o plasmodesmos.

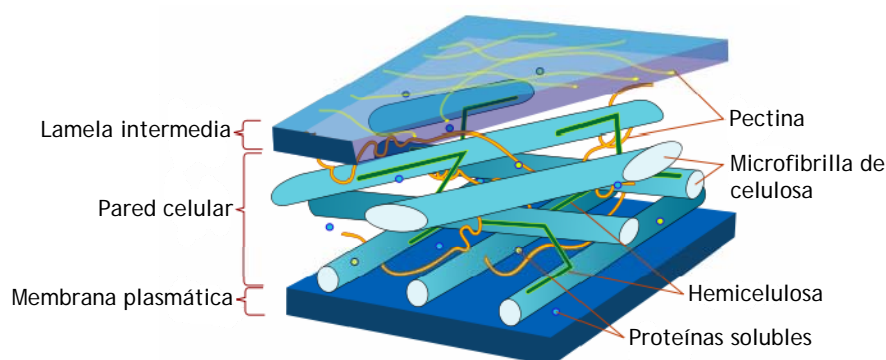
**Pared celular.** Exoesqueleto rígido que protege a la célula vegetal a la vez que proporciona soporte estructural a la planta. La pared celular de las plantas superiores está compuesta fundamentalmente por polisacáridos, concretamente por celulosa. La celulosa es un polímero lineal de moléculas de glucosa unidas por un enlace  $\beta(1-4)$ . En la pared celular múltiples

## Introducción

cadena de celulosa se asocian entre ellas en paralelo para formar las llamadas *microfibrillas de celulosa*. Estas microfibrillas están embebidas en una matriz compuesta por proteínas y otros polisacáridos como hemicelulosa y pectinas. La hemicelulosa, altamente ramificada, se encuentra unida por enlaces de hidrógeno a la superficie de las microfibrillas formando un fuerte entramado de moléculas responsable de otorgar resistencia mecánica a la pared celular ([figura i.2](#)). Las pectinas poseen un gran número de residuos de ácido galacturónico cargados negativamente que le permiten unir iones cargados positivamente y moléculas de agua para formar un gel.

Tanto la estructura como la función de la pared celular varían a medida que la célula vegetal crece. La pared en células en crecimiento se denomina **pared celular primaria**, la cual es relativamente fina y flexible permitiendo el crecimiento de la célula. Una vez ha cesado el crecimiento, la célula sintetiza una **pared celular secundaria** entre la pared celular primaria y la membrana plasmática. La pared celular secundaria es más gruesa y más rígida que la primaria. La composición entre ambas también varía, la primaria contiene aproximadamente igual cantidad de celulosa, hemicelulosa y pectina, la pared secundaria por el contrario carece de pectina y en ella el contenido en celulosa puede llegar a alcanzar al 80%. La orientación de microfibrillas de celulosa también difiere entre la pared primaria y secundaria. En la pared primaria parecen estar ordenadas al azar mientras que en la secundaria éstas se encuentran ordenadas en múltiples capas de microfibrillas con diferente orientación formando estructuras que aumentan considerablemente la resistencia de la pared celular ([figura i.2](#)).

Al contrario que en las células animales la célula vegetal no mantiene un balance osmótico entre el citosol y el medio extracelular. Por lo tanto, la presión osmótica favorece continuamente la entrada de agua en las células. Este influjo de agua está contrarrestado por la rigidez de la pared celular. La presión que se genera dentro de las células (presión de turgencia) es la responsable en gran medida de la rigidez de las plantas (Cooper, 2000).



**Figura i.2. Estructura de la pared celular.** Componentes fundamentales de una pared celular vegetal. Se pueden observar las múltiples capas de microfibrillas con diferente orientación unidas a través de hemicelulosa.

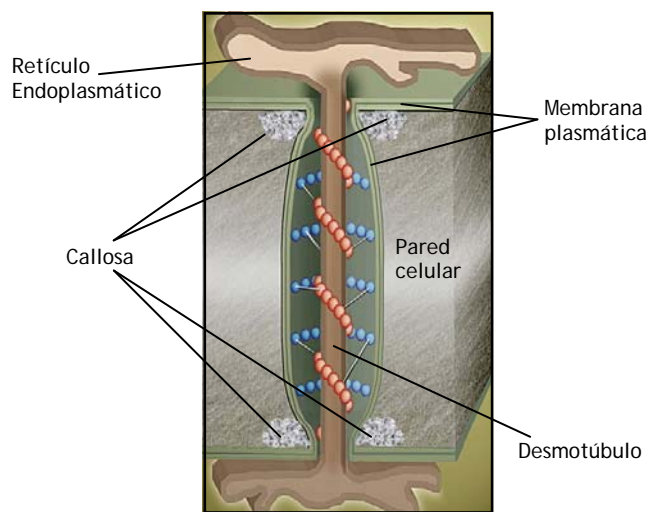
### i.1.2 Los plasmodesmos

La comunicación a través de la pared celular entre dos células vegetales adyacentes se produce por medio de los **plasmodesmos** (PDs). Éstos representan una vía de intercambio intercelular de moléculas tan dispares como: factores de transcripción (Kurata et al, 2005), RNAs patogénicos y no patogénicos (Kobayashi & Zambryski, 2007; Vogler et al, 2008), nutrientes e incluso agua. Los PDs desempeñan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de la planta así como en la defensa frente a patógenos, a pesar de lo cual, el conocimiento que se tiene sobre los PDs es aún muy rudimentario.

Los PDs son poros en la pared celular recubiertos por la membrana plasmática y atravesados por una prolongación del retículo endoplasmático conocida como **desmotúbulo**, que proporcionan continuidad de membrana y citosólica entre células adyacentes (figura i.3). Uno de los mecanismos propuestos para el control del flujo a través del plasmodesmo (PD) se basa en la dilatación/constricción de un anillo localizado en la entrada/salida del PD y cuyo componente fundamental sería la **callosa** (polisacárido de residuos de glucosa) (figura i.3). El espacio citoplasmático dentro de los PDs, entre la membrana plasmática y el desmotúbulo, está interrumpido por proteínas estructurales que crean microcanales a través de los cuales se

## Introducción

puede producir la difusión de pequeñas moléculas solubles. El mecanismo por el cual se produce el tráfico de proteínas de membrana a través del PD no está claro aunque los estudios realizados con la proteína de movimiento del virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) muestran que ésta puede difundir a través del PD de manera pasiva (Guenoune-Gelbart et al, 2008). Poco se conoce sobre las señales de direccionamiento al PD. Así, los dominios de direccionamiento identificados en diferentes proteínas con capacidad para circular por los PDs son muy variables y no parecen tener ningún patrón común.



**Figura i.3. Estructura de un plasmodesmo primario.** En el momento de formación de la pared celular elementos del retículo endoplasmático quedan atrapados formando el desmotúbulo. El flujo de proteínas solubles en el PD ocurre a través del espacio citoplasmático el cual se encuentra interrumpido por múltiples componentes como actina (esferas rojas) y otras proteínas aun sin definir (esferas azules). Adaptado de (Maule, 2008).

Los PDs primarios, formados durante la culminación de la citoquinesis, presentan una única cavidad central (figura i.3). A medida que la célula se desarrolla esta sencilla organización va siendo sustituida por una más compleja que incluye ramificaciones y múltiples cavidades centrales.

Por este motivo se considera que los PDs son más permisivos en los tejidos jóvenes que en aquellos más desarrollados.

Hasta la fecha se han descrito aproximadamente 30 proteínas que interactúan de alguna manera con los PDs. Entre las que cabe destacar, (1) una kinasa localizada en el PD (PAPK) con capacidad para fosforilar proteínas de movimiento virales además de otras proteínas de la planta que actúan en células diferentes a donde fueron sintetizadas y por tanto han de ser transportadas (NCAPs, *non-cell-autonomous proteins*) (Lee et al, 2005). (2) En un mismo trabajo, empleando técnicas proteómicas, se ha identificado, por un lado una glucanasa asociada al PD y por otro proteínas de función desconocida pero con motivos de unión a RNA (Faulkner et al, 2005). (3) Una nueva familia de receptores de membrana asociada exclusivamente al PD también ha sido recientemente identificada (PDLP1) (Thomas et al, 2008). Estas son proteínas integrales de membrana con un único dominio transmembrana y con una topología N-t luminal/C-t citoplasmático. Se ha propuesto para la familia PDLP1 una función en el control de flujo a través de PD. (4) También se ha detectado un grupo de proteínas con un dominio de unión a callosa. Su presencia junto con la existencia de glucanasas apoya el papel de la callosa en el control del flujo a través de los PDs (Rinne et al, 2005). (5) Por medio de un rastreo de mutantes en embriones de *Arabidopsis thaliana* se ha detectado recientemente una proteína (ISE2) capaz de aumentar el **tamaño límite de exclusión molecular del plasmodesmo (SEL)** (Kobayashi et al, 2007). ISE2 presenta un dominio RNA helicasa implicado en el silenciamiento génico post-transcripcional. Se ha propuesto que ISE2 afecta a la estructura del PD a través de la regulación del metabolismo de RNA.

## I.2 MOVIMIENTO DE LOS VIRUS DE PLANTAS

Los virus de plantas comparten numerosas características con los virus animales: morfología, composición, estrategias de expresión y replicación. Sin embargo a diferencia de los virus animales los virus de plantas en su movimiento de una célula a otra deben atravesar la rígida pared celular exclusiva de células vegetales.

## Introducción

La entrada inicial de un virus en una célula vegetal se produce por medio de una herida o de un vector físico, a continuación se produce el desensamblaje de la cubierta acoplado con la traducción y la replicación del genoma. Una vez sintetizadas todas las proteínas necesarias el virus será capaz de transportar su genoma a las células adyacentes, empleando los PDs como vía para atravesar la pared celular (no se ha descrito ningún virus de plantas que para su movimiento célula-célula no emplee los PDs (Hull, 2002)). Los virus cuentan en su genoma con unas proteínas, conocidas como **proteínas de movimiento** (MPs), encargadas de transportar el genoma hacia los plasmodesmos y aumentar el límite de exclusión de los mismos para permitir el paso del complejo ácido nucleico-proteína de movimiento o incluso de viriones completos (Lazarowitz & Beachy, 1999; Waigmann, 2004) desde la célula infectada a la célula adyacente.

### i.2.1 Entrada del virus a la célula vegetal

Para iniciar la infección los virus de plantas necesitan ser introducidos en la célula vegetal por un agente externo. El vector empleado por el virus determinará en parte el rango de plantas susceptible de ser infectadas. Generalmente la transmisión entre una planta infectada y otra sana se produce mediante insectos. Este tipo de transmisiones pueden clasificarse como: no persistentes, semi-persistentes y persistentes. En las transmisiones **no persistentes** el virus queda adherido al extremo del estilete del insecto, cuando éste se alimenta de otra planta provocará la infección. En las transmisiones **semi-persistentes** está implicada la zona inicial del aparato digestivo del insecto, mientras que en aquellos casos en los que el virus sea capaz de atravesar el intestino para acabar almacenándose en las glándulas salivares la transmisión será **persistente**. Muchos virus codifican en su genoma polipéptidos que son expuestos en la cubierta y que facilitan la interiorización del virión por parte del insecto. En algunos casos de transmisión persistente el virus presenta una envoltura lipídica (muy poco común en virus de plantas) que permite que sea endocitado por las células del insecto; dentro de las cuales transcurrirá parte del ciclo vital del virus, éste es el caso del virus de las manchas marchitas del tomate (*Tomato spotter wilt virus*, TSWV). También ha sido demostrada la capacidad de los nemátodos para actuar como vectores de virus de plantas (Gray, 1996). Éstos adquieren y transmiten el virus al alimentarse de las raíces de plantas infectadas. Al igual que en la transmisión vía insectos, existen en este caso

virus persistentes y no persistentes, aunque no se ha identificado ningún caso en el que el virus sea capaz de replicarse en el interior del nemátodo. Por medio de la savia también se transmitirá la infección si hay contacto entre una planta sana y otra infectada, lo que suele producirse en las prácticas propias de la agricultura y la ganadería.

La transmisión de un virus de generación en generación ocurre aproximadamente en el 20% de los virus de plantas. La transmisión por medio de la semilla se produce por la invasión del embrión vía el óvulo o a través de gametos infectados (Kneller et al, 2006), aunque el mecanismo por el cual se produce la infección del embrión aún se desconoce.

### **i.2.2 Desensamblaje de la cubierta viral**

Una vez en el interior de la célula vegetal es necesario que el virus se desprenda de la cubierta para poder comenzar la replicación de su genoma. La mayoría de virus de plantas presentan un genoma de RNA de simple cadena y polaridad positiva (ssRNA+) que puede ser reconocido directamente por la maquinaria de traducción. El desensamblaje de la cápside se produce acoplado al inicio de la traducción lo que permite que el RNA viral quede protegido en todo momento, primero por la cápside y progresivamente por la maquinaria de traducción de la célula huésped, lo que evita su posible degradación dentro de la célula infectada.

Los factores que desencadenan el proceso de desensamblaje de la cubierta se desconocen pero se ha propuesto que el cambio de pH o la baja concentración de calcio en el interior de la célula podrían ser los factores desencadenantes (Shaw, 1999). En el caso del TMV la proteína de la cápside (CP) presenta un dominio de unión a  $Ca^{2+}$ . Se ha postulado que la diferencia de los niveles de calcio entre el interior del virión y el citoplasma de la célula vegetal provocarían la difusión del  $Ca^{2+}$  unido a la CP del virus hacia el citoplasma, proceso que dispararía el desensamblaje de la cubierta proteica.

### **i.2.3 Replicación y traducción del genoma viral**

El proceso de desensamblaje comienza liberando el RNA viral por su extremo 5', permitiendo que esta región sea la primera reconocida por la

## Introducción

maquinaria celular de traducción (es el caso de los virus con un genoma ssRNA+, como los estudiados en la presente tesis). Las primeras proteínas virales en ser traducidas (aquellas codificadas en el extremo 5') son las implicadas en la replicación del propio genoma viral. La replicación se produce generalmente en los llamados **complejos de replicación**. Éstos son compartimentos derivados de diferentes membranas celulares en los que coinciden todos los componentes necesarios, tanto de origen viral como de la célula huésped, para la efectiva traducción y replicación del RNA viral (Miller et al, 2003; Nagy & Pogany, 2006; Reichel & Beachy, 1998; Zhang et al, 2005) y cuya formación está inducida por el propio virus. Según el tipo de virus el sistema de endomembranas responsable de albergar la replicación puede variar (endosomas, lisosomas, retículo endoplasmático, o mitocondrias (Salonen et al, 2005)). La formación de estos complejos de replicación depende en gran medida de la **RNA polimerasa RNA dependiente del virus (RdRp)**, una de las primeras proteínas virales en ser sintetizada. Los complejos de replicación protegen los intermediarios de dsRNA producidos en el proceso de replicación al mismo tiempo que aceleran la replicación y traducción del RNA del virus.

El ssRNA+ viral es utilizado como molde por la RdRp para la síntesis de ssRNA- que más adelante funcionará a su vez como molde para la polimerización de cadenas de ssRNA+. Éstas pueden ser de dos tipos, completas (genómicas) y subgenómicas (sgRNA), estas últimas funcionarán como RNA mensajero (mRNA) en la traducción de las proteínas virales. En este proceso es fundamental la existencia de un exceso de cadenas positivas sobre las negativas pero los factores que controlan este balance se desconocen (Ahlquist et al, 2003). Las cadenas de ssRNA+ servirán como moldes para la replicación y al mismo tiempo para la traducción de las diferentes proteínas virales, el destino de estas moléculas de RNA parece estar controlado mediante la fosforilación de los enzimas implicados en el proceso de síntesis (Jakubiec & Jupin, 2007). En células eucariotas existen dos requisitos fundamentales para la correcta traducción de los mRNA celulares: la estructura **CAP** en el extremo 5' y la cola **poli-(A)** en el 3'. El reconocimiento de estas dos estructuras por la maquinaria celular permite la circularización del mRNA, lo que incrementa la afinidad de los factores de iniciación de la traducción y de los ribosomas por el mRNA y entre ellos (Pestova et al, 2001). En muchos casos los virus de ssRNA+ carecen de estas dos estructuras para iniciar la traducción, en su lugar presentan los denominados **sitios internos de entrada del ribosoma (IRES)**. Los IRES



pueden encontrarse tanto en 5', en 3', o incluso en regiones internas, y permiten el reclutamiento del ribosoma sin necesidad del CAP (Kneller et al, 2006).

#### **i.2.4 Movimiento célula-célula**

Los virus ssRNA+ de plantas han desarrollado múltiples estrategias para transportar su genoma de una célula a otra, todas ellas a través de los plasmodesmos y dependientes del sistema de transporte de la propia célula. En todos los caso existen unos pasoss comunes; el uso de la red de actina y del retículo endoplasmático, el reconocimiento, unión y aumento del limite de exclusión de los plasmodesmos y una estricta regulación del proceso.

Como ya se ha apuntado anteriormente los virus de plantas codifican en su genoma para una o más proteínas encargadas de facilitar el movimiento del virus de una célula a la célula adyacente denominadas proteínas de movimiento; transporte que también requerirá en algunos casos de la CP.

#### **Movimiento basado en la formación de complejos ribonucleo-proteicos**

La investigación del transporte del TMV ha desempeñado un papel fundamental en la comprensión de las actividades que se adjudican a las MPs de los virus de plantas (Beachy & Heinlein, 2000). Así, la MP del TMV se asocia en las primeras etapas del proceso de infección al ER y a los plasmodesmos, más adelante se detecta en complejos de replicación asociados al ER y también junto a los microtúbulos. En fases avanzadas de la infección, la MP sólo es detectada en los PDs (Heinlein et al, 1998). Cabe destacar que muchas MPs, incluida la del TMV, son consideradas proteínas integrales de membrana (Fujiki et al, 2006; Verchot-Lubicz, 2005; Vilar et al, 2002).

Para realizar el movimiento intercelular la MP del TMV, una vez localizada en el ER, podría unir el RNA viral y transportarlo desde los complejos de replicación hasta el desmotúbulo por medio de la red de membranas del ER (Boevink & Oparka, 2005). Este proceso está íntimamente relacionado con los filamentos de actina. El direccionamiento al plasmodesmo se produciría por una capacidad intrínseca de la MP para

## *Introducción*

unirse a la red de actina y dirigirse al PD o bien por la unión del complejo a una proteína de la célula huésped que de manera natural sea dirigida al PD. También se ha propuesto que el TMV podría, tras la formación de los complejos de replicación a partir de las membranas del ER, dirigir el RNA viral hasta los PDs empleando como vehículo para el transporte los propios complejos de replicación (Kawakami et al, 2004) y utilizando los microfilamentos de actina como guía en el movimiento de los complejos (Liu et al, 2005). En este caso es el complejo entero (vesícula de membrana con RNA y proteínas virales) el que se dirigiría hasta los plasmodesmos. Sin embargo, la formación de estos complejos no parece ser necesaria ni para la replicación ni para el movimiento del virus en el caso del TMV (Mas & Beachy, 1999).

La MP del TMV es capaz de interactuar con microtúbulos y de unir RNA. También se ha especulado con la posibilidad de que fuese el complejo RNA-MP-microtúbulos independientemente de las membranas del retículo el que dirigiría el genoma del virus a los PDs (Boyko et al, 2002; Ferralli et al, 2006). En este escenario los complejos de replicación simplemente facilitarían la unión del RNA viral a la MP haciendo coincidir en la célula los procesos de síntesis de RNA y de traducción de la MP. No obstante, la acumulación de la MP en los microtúbulos no es imprescindible para el avance de la infección (Gillespie et al, 2002). Aunque la mayoría de los estudios han sido realizados con el TMV se asume que los resultados obtenidos serían aplicables a todos aquellos virus en los que el RNA es transportado formando complejos con proteínas de movimiento, independientemente de que los virus posean una o más proteínas de movimiento.

Muy pocas interacciones han sido descritas entre las proteínas de movimiento y los plasmodesmos. Estas proteínas parecen unirse a la periferia de los PDs y no a una diana concreta (Pouwels et al, 2002). También se han observado secuencias de direccionamiento vesicular en múltiples proteínas de movimiento, lo que sería indicativo del transporte de estas proteínas en vesículas de secreción y/o endocíticas. En algunos de los virus en cuyas MPs se han encontrado estos motivos conservados, se ha demostrado también su movimiento por medio del transporte vesicular de la célula huésped (Haupt et al, 2005). El aumento del SEL de los PDs parece ser un paso fundamental en el transporte del virus de una célula a otra. Se desconoce sin embargo cómo las MP pueden modificar el SEL. La

demostración de la interacción de una de las MP del PVX (*Potato X potexvirus*) con una enzima con capacidad para digerir callosa sugiere que una de las estrategias empleadas por el PVX para aumentar el SEL podría ser la aceleración de la degradación de callosa (apartado i.1.2). La MP del TMV es capaz de interactuar con calreticulina lo que también podría variar el SEL por medio de la influencia que esta proteína tiene sobre los niveles locales de  $Ca^{2+}$ .

Existen muy pocos datos estructurales acerca del mecanismo empleado por las MPs para translocar o bien el RNA o el complejo ribonucleo-proteico a través del plasmodesmo. Se ha propuesto la participación en el proceso de la familia de chaperonas Hsp70, tras encontrarse que una de las MP del virus del amarilleo de la remolacha (*Beet yellow closterovirus*, BYC) presenta un dominio análogo a las Hsp70 (Boevink & Oparka, 2005). Estas proteínas son capaces de auto-translocarse a través del PD de manera activa.

### **Movimiento guiado por túbulos**

Algunos virus son capaces de moverse a través del plasmodesmo en forma de viriones completos. En estos casos es necesaria la formación de un túbulo de origen viral que cruce el plasmodesmo y que permita el paso de los viriones por el PD. Fue en el virus del mosaico del chicharro (*Cowpea mosaic virus*, CPMV) donde por primera vez se observó la capacidad para la formación de estos túbulos, los cuales están formados por múltiples subunidades de la MP del virus.

Las MPs de los virus formadores de túbulos podrían alcanzar los PDs de dos maneras: (1) difundiendo desde su lugar de síntesis a la membrana plasmática y más tarde a los plasmodesmos. Esta idea se basa en que tratamientos con *orizalina* y *latrunculina* (sustancias capaces de desestabilizar los microtúbulos y filamentos de actina respectivamente) no afectan a la localización de las MPs en los PDs; o (2) las MP o incluso los viriones serían transportados hacia los plasmodesmos mediante su asociación con vesículas de la ruta secretora derivadas del aparato de Golgi. En ambos casos el ensamblaje de las MPs al formar los túbulos capturaría en su interior las partículas virales a transportar que posteriormente serían liberadas en la célula adyacente tras la desestructuración de los túbulos.

### **i.2.5 Transporte sistémico**

El transporte sistémico de un virus de plantas se puede dividir en 4 etapas. (1) Entrada del virus en el parénquima vascular a través de las células de la vaina. (2) Translocación a las células acompañantes y a continuación a los elementos cribosos del parénquima vascular. (3) Transporte por los elementos cribosos hacia otros órganos de la planta. (4) Entrada desde los elementos cribosos y las células acompañantes al parénquima vascular de regiones no infectadas.

El paso de las células del mesófilo al parénquima vascular no presenta ningún obstáculo para el virus diferente a los asociados al movimiento entre células del mesófilo, mientras que la infección de las células acompañantes sí representa un paso limitante en el transporte sistémico del virus (Moreno et al, 2004). Una vez alcanzadas las células acompañantes los virus tienen un fácil acceso a los elementos cribosos debido a que los plasmodesmos que conectan estos tipos de células presentan una estructura diferente a los que se encuentran entre células del mesófilo, y un SEL muy elevado que no restringe el paso del virus. El mecanismo y la forma (complejo ribonucleo-proteico o virión) con la que el virus alcanza estas células se desconocen. Una vez el virus se encuentra en el floema viajará (como virión en la mayoría de los casos) con el flujo de fotoasimilados. Del mecanismo de salida del sistema floemático se tienen pocos detalles aunque podría producirse un proceso inverso al de entrada salvando las diferencias existentes entre los tejidos de partida y de destino.

### **i.2.6 Regulación del movimiento**

La autorregulación del movimiento por parte del virus tiene como finalidad minimizar el daño sobre el huésped. El virus debe asegurarse de que los efectos producidos por el aumento del SEL no se prolonguen en el tiempo más allá de lo necesario. La MP del TMV es rápidamente degradada, aproximadamente a una distancia de seis células del frente de infección (Szecsi, 1999). Es más, el aumento del SEL que produce la MP sobre los PD parece estar limitado al frente de infección a pesar de que la MP pueda ser detectada en los PDs durante más tiempo (Oparka et al, 1997). Se ha postulado que la regulación de la capacidad de la MP para aumentar el SEL se produciría por la fosforilación de la propia MP (Trutnyeva et al, 2005;

Waigmann et al, 2000). Este proceso sería llevado a cabo aparentemente por una kinasa asociada al PD (Citovsky et al, 1993). También se ha descrito que la entrada de la MP en las cavidades centrales de los plasmodesmos (ver apartado i.1.2) alejaría a la propia MP del sitio activo de la kinasa (Ding et al, 1992). La MP del TMV tras su poli-ubiquitinación es degradada por el proteosoma 26S (Reichel & Beachy, 2000), proceso que también podría jugar un papel en la regulación de la infección.

En el virus de la parte superior de la mata de la patata (*Potato mop top virus*, PMTV) se ha encontrado que una de sus tres proteínas de movimiento (TGBp2) es capaz de retirar a la otra MP del virus (TGBp3) de los PDs evitando así un efecto permanente en el aumento del SEL en las fases finales del proceso de infección (Yang et al, 2000).

### I.3 LAS PROTEÍNAS DE MOVIMIENTO VIRAL

Los diferentes pasos del proceso de movimiento de los virus de plantas entre dos células adyacentes están controlados por las proteínas de movimiento. Éstas, como se ha podido ver en el apartado anterior, presentan una serie de características comunes, al menos por lo que respecta a los virus ssRNA+.

(1) **Capacidad de unión de RNA.** La característica más común de las proteínas de movimiento es su capacidad para unir RNA de forma cooperativa y sin especificidad de secuencia. Esta unión se produce a través de un dominio helicoidal rico en aminoácidos con carga neta positiva (Citovsky et al, 1992; Herranz & Pallas, 2004; Marcos et al, 1999; Vilar et al, 2001; Vilar et al, 2005), aunque los detalles moleculares de esta interacción se desconocen. En ausencia de datos estructurales de alta resolución los estudios de microscopía electrónica (Citovsky et al, 1992) y microscopía de fuerza atómica (Kiselyova et al, 2001) de los complejos formados por las MP y el RNA viral revelan la formación de filamentos extendidos de aproximadamente 1.5-3.5 nm de diámetro, dimensiones que permitirían el transporte de estos complejos a través del PD dilatado (~3-4 nm) (Lucas, 1995; Oparka et al, 1999). Las MPs actuarían como chaperonas que además de proteger el vRNA lo mantendrían en un estado desplegado que permita su transporte a través del PD.

(2) **Interacción con el sistema de membranas de la célula y con el citoesqueleto.** En al menos un virus de cada uno de los subgrupos de virus de ssRNA+ (apartado i.3.1) se ha descrito la interacción entre el sistema de membranas de la célula y una de las MPs del virus (Deom et al, 1990; Morozov & Solovyev, 2003; Reichel & Beachy, 1998; Vilar et al, 2002). Esta interacción puede ser necesaria para la correcta replicación del virus, para el reconocimiento del RNA por parte de la MP o para el direccionamiento de la MP y el RNA viral a los PDs. La interacción de las MPs con el citoesqueleto fue descrita por primera vez en la MP del BYV (Karasev et al, 1992). Más tarde se observó la capacidad de la MP del TMV para interactuar con tubulina (Gillespie et al, 2002) y con actina (Wright et al, 2007). El papel tanto de los filamentos de actina como de los microtúbulos es aún un tema objeto de debate (apartado i.2.4).

(3) **Interacción con los PDs y aumento del SEL.** La localización de las MPs en los PDs ha sido demostrada extensivamente (Atkins et al, 1991; Erhardt et al, 1999; Oparka et al, 1997; Sokolova et al, 1997), al igual que la capacidad de estas proteínas para aumentar el SEL (Waigmann et al, 1994; Wolf et al, 1989), de hecho, para el estudio del mecanismo de acción de los plasmodesmos se han empleado las MP virales como proteínas integrales de membrana modelo capaces de atravesar la pared celular.

Todas estas funciones se encuentran repartidas entre las MPs del virus. En algunos casos los genomas de los virus de plantas codifican una única MP que realizaría todas las funciones anteriormente descritas, mientras que en otros el virus codifica dos o incluso tres proteínas de movimiento, en cuyo caso puede existir un reparto de las funciones entre las distintas MPs.

### i.3.1 Clasificación de las proteínas de movimiento viral

Las proteínas de movimiento se pueden agrupar en cuatro grandes grupos:

- La Superfamilia 30k
- El bloque de los dos genes (*Double Gene Block*, DGB)
- El bloque de los tres genes (*Triple Gene Block*, TGB)
- Proteínas de movimiento del género *Tymovirus*

### **La superfamilia 30k**

Sin duda la proteína más estudiada de este grupo y que da nombre a la superfamilia es la MP del TMV. Proteína de 268 aminoácidos (~30 kDa) que presenta todas las funciones requeridas para el movimiento del virus (unión de RNA, interacción con el citoesqueleto y con el ER, aumento del SEL, etc.) repartidas en diferentes dominios. Históricamente se la ha considerado como una proteína integral de membrana, anclada a la bicapa mediante dos regiones hidrofóbicas (Brill et al, 2000; Reichel & Beachy, 1998).

A pesar de la baja similitud de secuencia que presentan algunas proteínas dentro de esta superfamilia se suponen para todas las MP del grupo las mismas funciones e incluso una estructuración similar de los dominios que la descrita para la MP del TMV. Dentro de la superfamilia conviven MP con y sin capacidad para la formación de túbulos.

### **El bloque de los dos genes (*Double Gene Block*, DGB)**

Los virus de este grupo se caracterizan por presentar dos pequeñas proteínas de movimiento (de entre 6 y 10 kDa aproximadamente). Estas dos proteínas, a pesar de no tener ningún tipo de homología de secuencia con la superfamilia 30kDa, poseen dominios que desempeñan funciones similares; si bien estas funciones se encuentran repartidas entre los dos polipéptidos.

El caso mejor estudiado dentro de este grupo es el del virus del moteado del clavel (*Carnation mottle virus*, CarMV), el cual presenta una primera proteína de movimiento (p7) capaz de unir RNA mediante un dominio helicoidal (Marcos et al, 1999; Vilar et al, 2001; Vilar et al, 2005), mientras que la otra MP (p9) es una proteína integral de membrana con dos regiones TM y sus extremos N- y C-terminal orientados hacia el citosol (Vilar et al, 2002). Se ha propuesto un mecanismo de acción para el transporte intracelular del RNA viral de los *Carmovirus* según el cual, p7 realizaría la función de unión al RNA e interaccionaría al mismo tiempo con p9, la cual se encargaría del direccionamiento del complejo a la red de membranas y al plasmodesmo (Vilar et al, 2002), aunque hasta el momento la interacción entre p7 y p9 no ha podido ser demostrada.

### **El bloque de los tres genes (*Triple Gene Block*, TGB)**

A este grupo pertenecen aquellos virus que presentan tres proteínas de movimiento (TGBp1, TGBp2 y TGBp3). TGBp1 es una proteína citoplasmática mientras que TGBp2 y TGBp3 contienen secuencias hidrofóbicas que permiten su anclaje a membranas. Dentro del TGB existen dos subgrupos, *Hordeivirus* y *Potexvirus*, con un mecanismo para el movimiento célula-célula diferente. Los *Hordeivirus* presentan un mecanismo de acción similar al de los virus del DGB mientras que en el grupo de los *Potexvirus* la CP es requerida para el movimiento entre células adyacentes (Morozov & Solovyev, 2003). TGBp1 presenta un dominio helicasa y es capaz de unir RNA sin especificidad de secuencia, será por tanto la encargada de transportar el genoma viral hacia el plasmodesmo. Si bien la TGBp1 de los *Potexvirus* es capaz de interactuar directamente con el PD y de aumentar el límite de exclusión molecular, en el grupo de los *Hordeivirus* serán TGBp2 y TGBp3 las encargadas de realizar estas dos funciones (Zamyatnin et al, 2004).

Ambos subgrupos dependen de la red de membranas del ER para su transporte hacia los PDs. En cambio, la composición del complejo transportado así como las funciones desempeñadas por cada una de las MP varían entre los dos grupos.

### **Proteínas de movimiento del género *Tymovirus***

Los virus pertenecientes al género *Tymovirus* codifican en su genoma para una única MP, la cual presenta un tamaño molecular de entre 69 y 85 kDa. Al igual que la MP del TMV las proteínas de movimiento de los virus de éste género son capaces de unir RNA, aumentar el SEL y transportar el vRNA a través del plasmodesmo (Drugeon & Jupin, 2002).

## **I.4 RESPUESTA DE LA PLANTA A LA INFECCIÓN VIRAL**

La planta responde a la infección de diferentes maneras, uno de los sistemas actualmente más estudiados para combatir las infecciones es el basado en RNAs de interferencia (Kasschau & Carrington, 1998). El proceso de RNA de interferencia (iRNA) se activa por la existencia de dsRNA. El dsRNA es el sustrato de una enzima conocida como *DICER*. Esta enzima es una



endonucleasa que corta el dsRNA en pequeños fragmentos (21-24 nucleótidos) conocidos como **RNAs interferentes pequeños** (siRNA). Éstos son incorporados al **complejo de silenciamiento inducido por RNA** (RISC), el cual separa las dos hebras de RNA, RISC es entonces capaz de reconocer a mRNAs que presenten homología con una de las hebras generadas a partir del siRNA y degradarlos. Algunos de los siRNA no son degradados sino que son empleados como cebadores para la síntesis de cadenas de dsRNA, lo que aumenta la sensibilidad del sistema (Mahmood ur et al, 2008). Una característica del silenciamiento de RNA en plantas es la existencia de dos especies diferentes de siRNA, una implicada en señalización en distancias cortas y otra en metilación del DNA y expansión sistémica del silenciamiento (Hamilton et al, 2002).

Los virus de ssRNA generan en su ciclo replicativo intermediarios de doble hebra que pueden servir de dianas para el mecanismo de iRNA. Por otro lado como ya se ha comentado también ha sido demostrada la participación de RpRd de la planta en el proceso de silenciamiento génico mediante iRNA (Mourrain et al, 2000). En este sentido el RNA viral es transformado a dsRNA por la planta y procesado entonces por la nucleasa DICER.

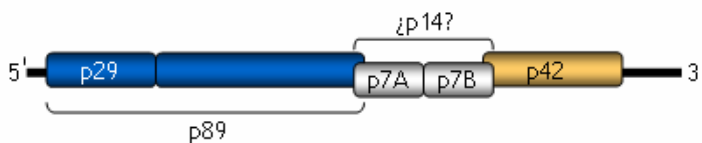
## **I.5 ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS VIRUS ESTUDIADOS EN LA PRESENTE TESIS**

### **i.5.1 Virus de las manchas necróticas del melón (MNSV)**

El virus de las machas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) pertenece al género *Carmovirus* dentro de la familia *Tombusviridae*. Su cápside presenta un tamaño de 30 nm de diámetro aproximadamente y está constituida por unas 180 subunidades de la CP. Su genoma está compuesto por una única molécula de RNA de simple cadena y polaridad positiva (ssRNA+) de 4.3 kb. Genoma que presenta 5 pautas de lectura abiertas (ORFs) flanqueadas por dos regiones no traducibles (Genoves et al, 2006; Riviere & Rochon, 1990). El extremo 5' no traducible (UTR) tiene un tamaño de entre 87 y 95 nucleótidos, y se desconoce si presenta alguna estructura CAP. El 3' UTR es sin embargo de mayor tamaño (280 nucleótidos), no está poliadenilado (poliA) pero contiene estructuras secundarias similares a las descritas para otros *Carmovirus* que podrían ser

## Introducción

importantes para su replicación. La primera de las ORFs de su genoma codifica para una proteína de 29 kDa (p29) que finaliza en un codón de parada ámbar; cuando esta parada es ignorada se produce una proteína de 89 kDa (p89) (figura i.4). Tanto p29 como p89 son necesarias para la replicación del virus. La más pequeñas (p29) contiene un dominio helicasa mientras que p89 actuaría como una RNA polimerasa (Genoves et al, 2006). A continuación hay dos pequeñas ORFs que codifican para dos proteínas de 7 kDa (p7A y p7B) ambas imprescindibles para el movimiento del virus (MPs). Estas dos ORFs se encuentran en la misma pauta de lectura y separadas de nuevo por un codón ámbar, por lo que la existencia de una proteína de fusión de 14 kDa (p14) no puede ser descartada aunque su presencia no haya sido probada hasta la fecha (Genoves et al, 2006). En el extremo 3' y solapada con el extremo 3' del gen de p7B se encuentra la última de las ORFs del virus, su traducción produce una proteína de 42 kDa (p42) responsable de la formación de la cápside (Ohshima et al, 2000) (figura i.4). El RNA genómico (gRNA) actuaría como mensajero para la traducción de p29 y p89. La síntesis de las dos proteínas de movimiento y de la CP se produciría a partir de dos RNAs subgenómicos, sgRNA 1 y 2 repectivamente.



**Figura i.4. Representación esquemática del genoma del MNSV.** El MNSV codifica en su extremo 5' para p29 y p89 (azul) ambas implicadas en la replicación del virus (Genoves et al, 2006). p89 es producto del *readthrough* del codón de parada ámbar que delimita el extremo C-t de p29. A continuación se encuentran las proteínas de movimiento p7A y p7B (gris) separadas también por un codón ámbar, cuyo *readthrough* produciría una hipotética proteína de movimiento de 14 kDa (p14). En el extremo 3' se localiza la CP (p42) (naranja).

### i.5.2 Virus del arrugamiento del nabo (TCV)

El virus de la arrugamiento del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV) pertenece al igual que el MNSV al género *Carmovirus*. Los viriones son isométricos sin envuelta y de aproximadamente 28 nm de diámetro, con una cápside

proteica formada por una única proteína de 42 kDa. El TCV presenta un genoma de ssRNA+ de 4054 bases con un corto extremo 5' UTR y un 3' UTR carente de cola poliA. La organización del genoma es similar a la del MNSV (Wang & Simon, 1997) (figura i.5). El gRNA es traducido en dos proteínas imprescindibles para la replicación del virus (White et al, 1995), p28 (de 28 kDa) y p88 (88 kDa), esta última producida cuando el codón ámbar en el que termina la síntesis de p28 es traducido como una Tyr. Al igual que en el MNSV p28 actuaría como una helicasa mientras que p88 es una RNA polimerasa. El resto de las proteínas del virus se producen a partir de dos sgRNA. El primero de ellos, de 1.7 kb, codifica para las dos proteínas de movimiento, p8 y p9 de 8 y 9 kDa respectivamente (Hacker et al, 1992), las cuales tienen sus pautas de lectura ligeramente solapadas, lo que impedirá la síntesis de una única proteína producto de la fusión de ambas proteínas de movimiento. El segundo sgRNA tiene un tamaño de 1.45 kb y actuará como mRNA para la síntesis de la CP (Carrington et al, 1987).



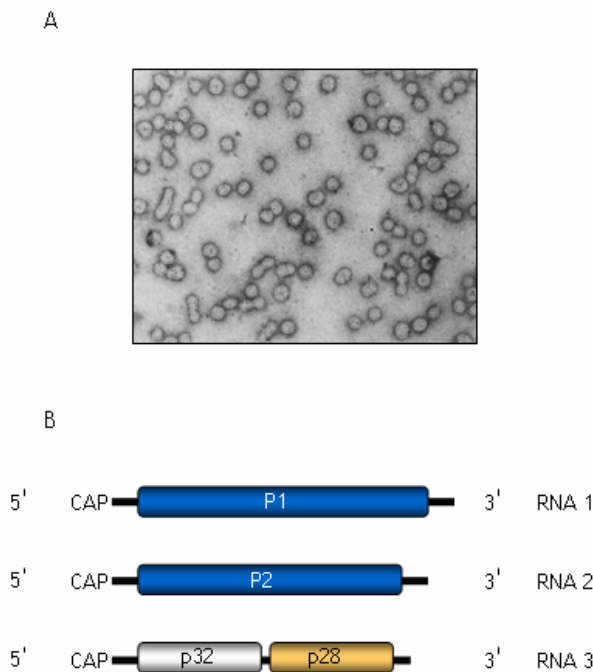
**Figura i.5. Representación esquemática del genoma de TCV.** En el genoma de TCV podemos encontrar dos proteínas implicadas en la replicación del virus p28 y p88 (azul), dos proteínas de movimiento p8 y p9 (gris) y una CP p42 (naranja) en el extremo 3'.

### i.5.3 Virus de los anillos necróticos del prunero (PNRSV)

El virus de los anillos necróticos del prunero (*Prunus necrotic ring spot virus*, PNRSV) es un virus icosaédrico (figura i.6 A) del género *Ilarvirus* que pertenece a la familia *Bromoviridae*. Presenta un genoma tripartito de ssRNA+ con un tamaño total de 8.056 kb (figura i.6 B). Los RNAs 1 y 2 actuarán como mRNA para la síntesis de las polimerasas P1 y P2 respectivamente. Estos RNAs presentan un tamaño de 3662 y 2507 bases cada uno. El RNA 3 (de 1887 bases) sirve de molde para la traducción de la proteína de movimiento p32 (32 kDa), además de codificar para una cuarta ORF a partir de la cual se sintetiza un sgRNA. La traducción de este mRNA produce la CP (Herranz & Pallas, 2004) (p28), de 28.8 kDa. La proteína de

## Introducción

movimiento del PNRSV ha sido enmarcada, debido a su tamaño y secuencia, dentro de la superfamilia 30k (apartado i.3.1) (Melcher, 2000). Cada uno de los RNAs genómicos del PNRSV presenta en su extremo 5' UTR una estructura CAP para el inicio de la traducción.



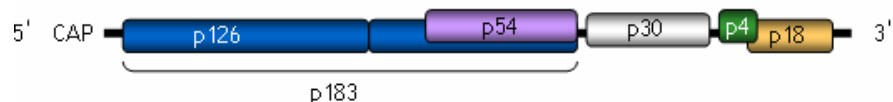
**Figura i.6** Micrografía electrónica y representación del genoma del PNRSV. A. Micrografía electrónica del PNRSV obtenida de (Brunt et al, 1996). B. El genoma tripartito ssRNA+ del PNRSV codifica para dos proteínas implicadas en la replicación del virus, P1 y P2 (azul) una proteína de movimiento p32 (gris) y una CP p28 (naranja).

### i.5.4 Virus del mosaico del tabaco (TMV)

El virus del mosaico de tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) ha representado un modelo no solo para la virología en general y en particular para el estudio de los virus de plantas sino también para el desarrollo de la biología molecular. La gran mayoría de datos que se tienen sobre el movimiento

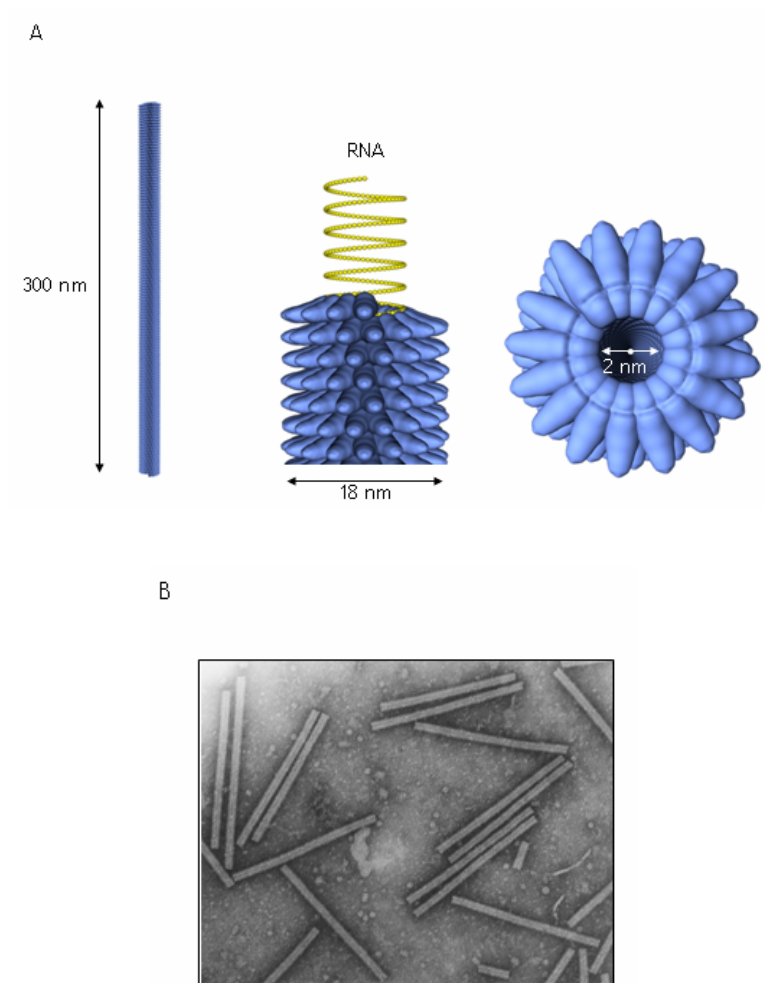
intra- e inter-celular de los virus ssRNA+ han sido obtenidos empleando como modelo el TMV o alguna de sus proteínas. No en vano su MP da nombre a la superfamilia 30k. El TMV pertenece al género *Tobamovirus* del cual es la especie modelo. Los viriones tienen forma de bastón (figura i.8 A y B), con una longitud de 300 nm y 18 nm de diámetro aproximadamente. En el interior de la cubierta proteica presenta un canal, de 2 nm de diámetro, en el cual se empaqueta su genoma (figura i.8 A).

El TMV es un virus monocatenario de ssRNA+ con un tamaño total de 6395 bases (Goelet & Karn, 1982). El extremo 5' UTR tiene una estructura tipo CAP mientras que el 3' carece de región poliA. Hasta la fecha han sido identificadas 5 ORFs. La primera de ellas (entre las bases 69 y 3419) codifica para una replicasa (p126), la cual finaliza su síntesis en un codón de parada ámbar. En los casos en los que este codón sea traducido por un aminoácido y no interpretado como una señal de parada de la traducción se obtendrá una proteína de 183 kDa (p183), también implicada en la replicación (figura i.7). A continuación hay una segunda ORF (entre las bases 4903 y 5709), traducida a partir de un sgrNA, que contiene la información necesaria para la síntesis de la MP de 30 kDa p30. En el extremo 3' del genoma se localiza la ORF correspondiente a la CP, proteína de 159 aminoácidos y 17.6 kDa (p18), también sintetizada a partir de un sgrNA. Recientemente han sido identificadas dos nuevas ORFs (Morozov et al, 1993), la primera de ellas localizada dentro de la secuencia de p183, codifica para una RNA polimerasa de 193 aminoácidos y 54 kDa (p54). La otra (localizada entre las bases 5666 y 5788) codificaría para una pequeña proteína de 40 aminoácidos (p4) de función aún desconocida (figura i.7)



**Figura i.7. Organización genómica del TMV.** El genoma del TMV codifica dos replicasas p126 y p183 (azul), esta última, producto del *readthrough* del codón de parada que delimita la síntesis de p126. Completamente solapada con p183 se encuentra una RNA polimerasa (p54) de 54 kDa (violeta). En la región central encontramos la MP p30 (gris) mientras que el extremo 3' codifica para la CP p18 (naranja). Parcialmente solapada con la secuencia de p18 se encuentra una pequeña ORF que codifica para una proteína de tan solo 4 kDa y de función aún desconocida (verde).

## Introducción



**Figura 1.8. Estructura tridimensional del TMV.** A. Representación de la estructura del viroide del TMV, en azul se muestra la CP mientras que en amarillo el RNA. Se indican las dimensiones aproximadas en nm del viroide, longitud (izquierda), diámetro (centro) y diámetro del canal donde se aloja el vRNA (derecha). B. Micrografía electrónica del TCV obtenida de (Brunt et al, 1996).

## I.6 MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Todas las células, ya sean eubacterias, arqueas o eucariotas, están delimitadas por membranas, cuyo componente estructural básico es una fina capa de moléculas anfipáticas organizadas en dos monocapas lipídicas enfrentadas, en las que residen multitud de proteínas asociadas a esta la bicapa de múltiples maneras. La membrana juega un papel fundamental para la supervivencia de las células, define los límites de la célula estableciendo una barrera para moléculas polares a la vez que delimita los diferentes compartimentos celulares. Esta compartimentalización interna permite la segregación de reacciones químicas para el aumento de su eficiencia así como la obtención de gradientes electroquímicos para la obtención de energía. Las membranas proporcionan protección a la vez que permiten el transporte selectivo y la comunicación a través de la bicapa.

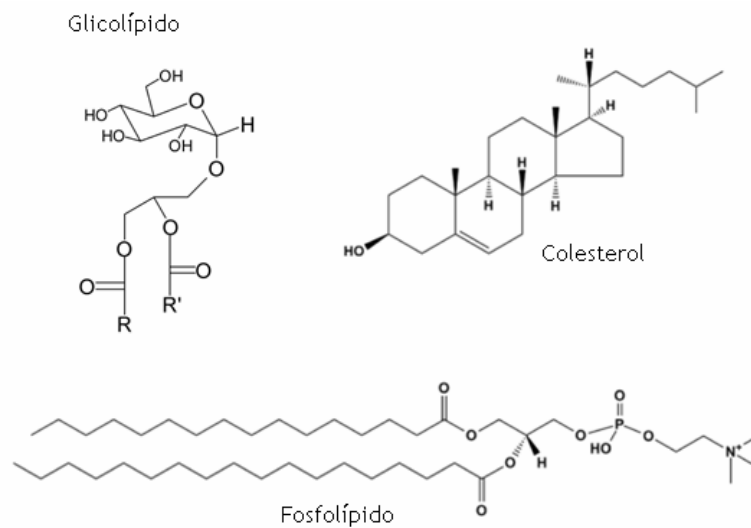
El componente lipídico de la membrana se organiza de manera espontánea. Esta organización está basada en la tendencia de las colas hidrocarbonadas hidrofóbicas a asociarse entre si y en la capacidad de las cabezas polares para interactuar con el medio acuoso, es decir con el citosol, el espacio extracelular o el interior de los orgánulos celulares. Diferencias en la estructura y composición de los lípidos que constituyen la bicapa afectarán a la estructura y la función tanto de las proteínas embebidas en la membrana como de aquellas proteínas asociadas a ésta de manera periférica. Las bacterias, protistas y organismos procariontes se diferencian tanto en la composición como en los tipos de lípidos que componen sus membranas. Es más, diferentes tipos celulares dentro de un mismo organismo presentan diferencias en la composición lipídica, incluso los orgánulos dentro de una misma célula eucarionte tienen un componente lipídico sensiblemente diferente.

### i.6.1 Componente lipídico

Los lípidos participan en tres procesos fundamentales. (1) En primer lugar son los principales constituyentes estructurales de las membranas biológicas. (2) Los lípidos son acumulados por la célula para almacenar energía, y como reservorio de componentes para la biogénesis de las membranas. (3) Una de las funciones menos estudiadas de los lípidos es su papel como mensajeros, tanto primarios como secundarios. La hidrólisis de lípidos anfipáticos

## Introducción

genera una doble señal que puede transmitirse por dentro de la membrana (por medio de la región hidrofóbica) y por el citosol (gracias a la cabeza polar) (Behnia & Munro, 2005). El papel de los lípidos en las membranas ha empezado a ser estudiado de manera significativa sólo recientemente, en parte debido a los complejos métodos requeridos para su estudio.



**Figura i.9. Principales lípidos de las membranas biológicas.** Representación de los tres principales tipos de lípidos; glicolípidos, fosfolípidos (PI en la imagen) y colesterol.

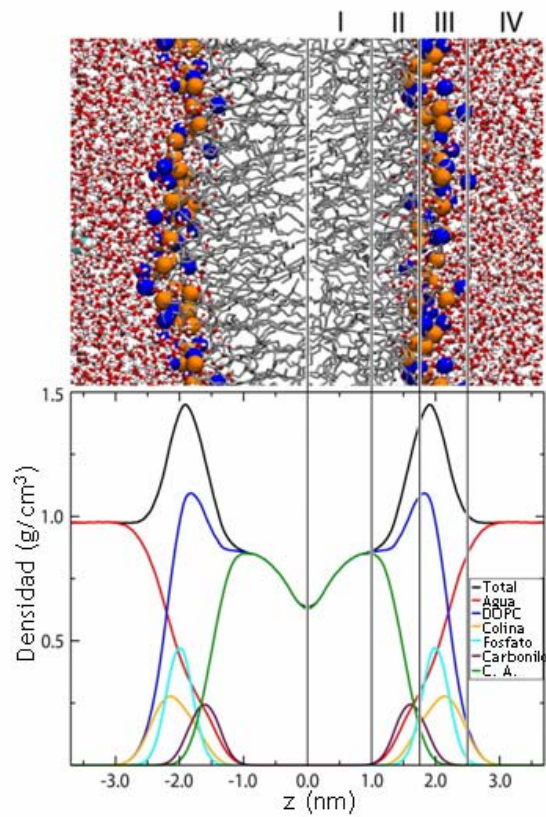
Las membranas celulares presentan fundamentalmente tres tipos de lípidos: fosfolípidos, glicolípidos y colesterol (figura i.9). Los **fosfolípidos** presentan una región polar formada como mínimo por un alcohol unido a un grupo fosfato y una apolar formada por dos ácidos grasos. Estos dos bloques se unen por medio de un glicerol o de una esfingosina, dando lugar a glicerolfosfolípidos como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) o fosfatidilserina (PS) y a esfingolípidos respectivamente, siendo los fosfolípidos basados en el glicerol los más abundantes. Los **glicolípidos** al igual que los esfingolípidos están basados en esfingosina, en este caso el grupo amino está acetilado por un ácido graso mientras que el grupo alcohol está unido a uno o más residuos de azúcar



(figura i.9). El **colesterol** por el contrario es bastante diferente al resto de lípidos de las membranas. Consiste en un esteroide formado por cuatro anillos hidrocarbonatos, en un extremo de la molécula presenta un grupo hidroxilo (el cual representará la parte polar de la molécula) y en el opuesto una cadena hidrocarbonada (región apolar) (figura i.9).

Las membranas se mantienen unidas en un ambiente acuoso debido a interacciones no covalentes entre los ácidos grasos, los cuales debido a su hidrofobicidad tienden a juntarse para excluir el máximo de agua, formando un entorno variable y anisotrópico. Atendiendo al perfil de densidad electrónica, una membrana modelo formada únicamente por *dioleoil-glicerol-fosfatidilcolina* (DOPC) se puede dividir en cuatro regiones (MacCallum et al, 2008) (figura i.10). Partiendo desde el centro de la bicapa, la **región I** contiene únicamente las colas hidrofóbicas de los lípidos, esta región constituye lo que generalmente se conoce como **núcleo hidrofóbico** y ocupa aproximadamente 30 Å de grosor. La **región II** contiene el principio de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos y la parte inicial de las cabezas polares, esta región comienza en el momento en que aparece algún grupo carbonilo y finaliza donde la línea de densidad de las cadenas acíclicas se encuentra con la de la colina (figura i.10). La región II es la de mayor densidad electrónica y la más diversa, contiene tanto componentes hidrofóbicos como hidrofílicos. La **región III** comienza en el máximo de densidad electrónica total del sistema y finaliza en el momento en el cual la mayoría de la densidad procede del agua, en ella encontramos la mayoría de los grupos fosfato y colina. Finalmente en los límites exteriores de la membrana se encuentra la **región IV**, compuesta fundamentalmente por agua y una pequeña porción de las cabezas polares de los lípidos. Se considera **región interfacial** la suma de las regiones II, III y IV, ésta representa alrededor de 15 Å de grosor a cada lado del núcleo hidrofóbico, es por tanto una característica fundamental del entorno de las proteínas de membrana.

Aproximadamente la membrana plasmática y la membrana del retículo endoplasmático en eucariontes contienen un 50% de PC, 10% de PE, 15% de PS, un 10% en esfingolípidos, en torno al 10% de colesterol y únicamente un 1% de fosfatidilinositol (PI). Estos porcentajes varían según el tipo de célula y de membrana, es más cada lípido tiene un elevado grado de heterogeneidad debido a la unión inespecífica de distintas cadenas de ácidos grasos.



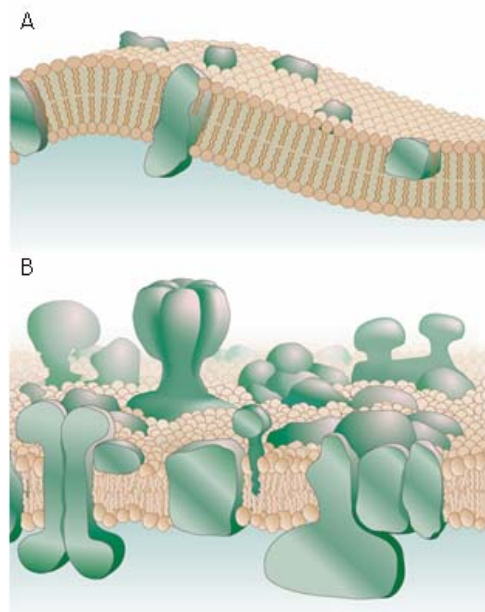
**Figura i.10. Perfil de densidad de una membrana modelo.** Arriba, modelización por dinámica molecular de una membrana compuesta únicamente por DOPC. El agua se muestra en rojo (oxígeno) y blanco (hidrógeno). Los átomos de nitrógeno y fosfato de los lípidos se muestran en azul y naranja respectivamente mientras que las cadenas hidrocarbonadas en gris. Bajo, Perfil de densidad electrónica de esa misma membrana en el que se pueden diferenciar las cuatro regiones descritas. Línea negra densidad electrónica total, roja la densidad correspondiente al agua, azul al DOPC, naranja a la colina, azul claro al fosfato, violeta a los carbonilos y en verde la correspondiente a las cadenas acílicas (C.A.) de los ácidos grasos (MacCallum et al, 2008).

Los fosfolípidos se reparten entre las dos monocapas de las membranas de manera asimétrica, este gradiente es mantenido por enzimas denominadas **flipasas**, enzimas que se encargan del intercambio de fosfolípidos entre las dos monocapas (Daleke, 2007). En el retículo endoplasmático hay una mayor abundancia de glicerol-fosfolípidos en la

monocapa citoplasmática de la membrana mientras que los esfingolípidos se localizan preferentemente en la monocapa luminal. En la membrana plasmática podemos encontrar una distribución similar. La monocapa citoplasmática está enriquecida en PI, PE, PS y ácido fosfatídico lo que produce un ambiente ligeramente negativo en este lado de la membrana que permite la unión de proteínas debido a interacciones electroestáticas (McIntosh & Simon, 2006). La cara extracitoplasmática de la membrana plasmática, topológicamente equivalente a la cara luminal de los orgánulos intracelulares, se encuentra enriquecida en PC, esfingomielina y glicoesfingolípidos. Los elevados niveles de colesterol de la membrana plasmática (a diferencia de los encontrados en la mayoría de las membranas intracelulares) otorgan a esta membrana un grado de rigidez elevado. La distribución asimétrica de colesterol y otros glicerol-fosfolípidos contribuyen a mantener la curvatura de la membrana (Maxfield & Tabas, 2005). Curvatura que también puede ser obtenida por otros mecanismos (Hanzal-Bayer & Hancock, 2007).

La relación proteína:lípido en peso en la mayoría de las membranas es aproximadamente 1:1 (Muller et al, 2008). El modelo clásico de la membrana del **mosaico fluido** (Singer & Nicolson, 1972) en el que las proteínas se encuentran en la bicapa a baja concentración, distribuidas homogéneamente y difundiendo libremente en una membrana estable y homogénea ha sido actualizado en las últimas décadas, dando una visión mucho más compleja de la que aportó el modelo de Singer y Nicolson (Engelman, 2005) (figura i.11).

Actualmente se considera que las membranas son estructuras altamente complejas y variables, con dominios lipídicos específicos que excluyen o agrupan a determinadas proteínas de manera específica (como las balsas lipídicas (*lipid rafts*) o microdominios enriquecidos en colesterol) y con una concentración proteica variable según el tipo de membrana. Las interacciones específicas que se establecen entre lípidos y proteínas impiden la libre difusión de ambos componentes (Kusumi et al, 2005), facilitan la inserción de las proteínas en la bicapa (Schneiter & Toulmay, 2007) y determinan en gran medida la estructura y función de las proteínas de membrana.



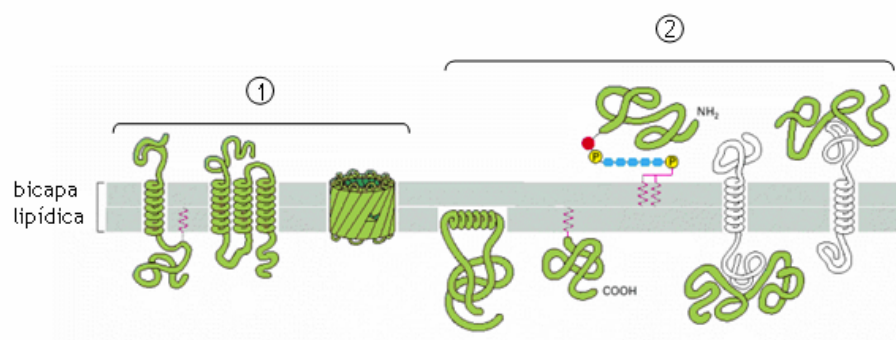
**Figura i.11. Modelo del mosaico fluido.** A. Modelo del mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson (Singer & Nicolson, 1972). B Versión actualizada de las membranas biológicas. Tomado de (Engelman, 2005).

### i.6.2 Componente proteico

Las proteínas de membranas son aquellas proteínas que residen y ejercen su función en la membrana. Atendiendo al tipo de interacción que establecen con la bicapa podemos diferenciar entre proteínas integrales de membrana y proteínas periféricas (figura i.12). Las proteínas integrales de membrana son aquellas que atraviesan la bicapa completamente. Las proteínas periféricas o asociadas, no interaccionan directamente con el núcleo hidrofóbico de la membrana, se encuentran por el contrario asociadas a la membrana a través de otras proteínas o bien a través de grupos lipídicos o hidrocarbonados unidos covalentemente a la proteína, también se consideran proteínas periféricas a aquellas incapaces de atravesar completamente la membrana. Los dominios integrados en la membrana contienen fundamentalmente residuos hidrofóbicos como Leu, Ile, Val o Ala, compatibles con la hidrofobicidad de la membrana. Básicamente han sido descritos dos motivos estructurales en las **regiones transmembrana (TM)**: los barriles beta y los

haces de hélices alfa. Estos tipos de estructuras secundarias permiten la inserción en la membrana de los esqueletos polipeptídicos al establecer puentes de hidrógeno intramoleculares y excluir el agua de solvatación del interior de las proteínas, reduciendo la polaridad intrínseca de los grupos CO y NH del enlace peptídico, cuyo momento dipolar permanente impediría su inserción en el núcleo hidrofóbico de la membrana.

La parte hidrofóbica de una  $\alpha$ -hélice se define generalmente como la parte requerida para atravesar el núcleo hidrocarbonado de la bicapa lipídica. Teniendo en cuenta una traslación de 1.5 Å/residuo en una hélice canónica, se requieren alrededor de 20 residuos para ocupar el núcleo hidrocarbonado (~30 Å) si la hélice no está inclinada con respecto a la normal de la bicapa, si hay una inclinación (*tilt*) el número de residuos aumentará.



**Figura i.12. Representación de los diferentes tipos de proteínas de membrana.** 1. Proteínas integrales de membrana basadas en alfa hélices y barriles beta. 2. Proteínas periféricas y asociadas a la membrana. Adaptado de (Lodish, 2000).

## I.7 PLEGAMIENTO Y ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS HELICOIDALES DE MEMBRANA

Las proteínas de membrana más comunes son aquellas basadas en motivos en alfa hélice. Los barriles beta son mucho menos abundantes y se encuentran casi exclusivamente en la membrana externa de procariontes, mitocondrias y cloroplastos. A pesar de que la fuerza motriz en el plegamiento y la estabilidad de ambos tipos de proteínas de membrana es la

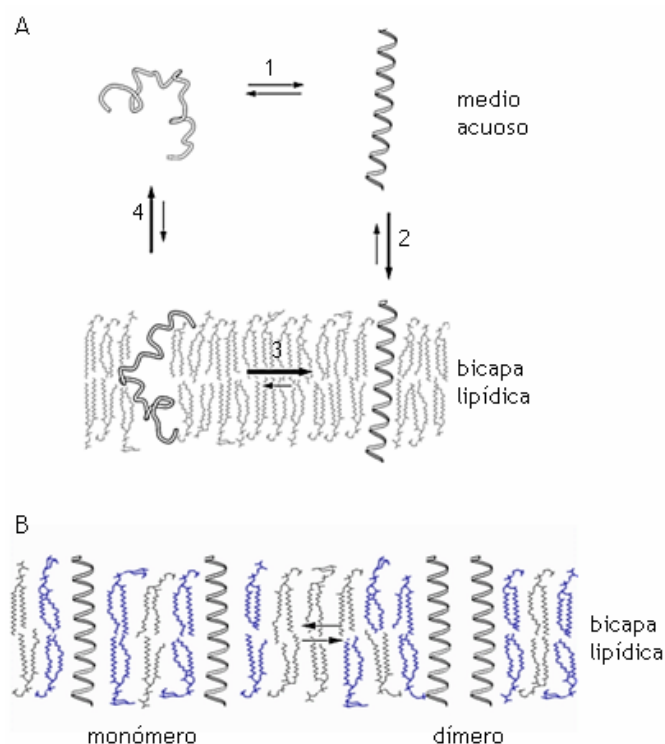
misma, la descripción que se realiza a continuación ignora las proteínas de membrana cuyo principal motivo estructural son las hojas beta para centrarse en el plegamiento y la estabilidad en membrana de las hélices alfa, dado que estas últimas son absolutamente mayoritarias.

### i.7.1 El modelo de dos estados

El conocimiento actual sobre el plegamiento de las proteínas de membrana es todavía rudimentario, sin embargo es evidente que se encuentra marcado por la naturaleza anisotrópica de la membrana. El actual modelo para el plegamiento de las proteínas helicoidales de membrana se basa en el propuesto a principios de los años 90 por Popot y Engelman (Popot & Engelman, 1990) conocido como **modelo de dos estados**. Según el cual el plegamiento de las proteínas de membrana se produce en dos etapas:

1. Las *secuencias hidrofóbicas forman alfa hélices cuando se insertan en la membrana*. En presencia de agua y una bicapa lipídica, una alfa hélice TM representa el estado más estable para una secuencia de aminoácidos apolares. Este argumento se basa en la estimación de las energías libres de los equilibrios descritos en la [figura i.13 A](#) e ignora el mecanismo por el cual estas secuencias alcanzan la membrana.

Dado que el número de enlaces de hidrógeno del esqueleto polipeptídico no es crítico en un medio acuoso, se considera que la transición entre una secuencia desestructurada y una hélice alfa es isoenergética y estará gobernada por las cadenas laterales de los aminoácidos (transición 1 en [figura i.13 A](#)). Una hélice formada por residuos hidrofóbicos presenta una elevada tendencia a localizarse en la bicapa debido a la dramática reducción en la entropía del agua necesaria para que esa misma hélice permanezca en el medio acuoso (transición 2 en [figura i.13 A](#)). El equilibrio de una secuencia de alrededor de 20 aminoácidos sin estructura entre agua y lípido se ha estimado en 40 kcal/mol a favor del agua, debido a la pérdida de enlaces de hidrógeno entre la proteína y el agua que se produce si esta secuencia entra en la bicapa (transición 4 en [figura i.13 A](#)) (White & von Heijne, 2008).



**Figura i.13. Modelo de dos estados A.** Equilibrio termodinámico para la formación de una hélice hidrofóbica. La localización y estructura de una secuencia hidrofóbica en un ambiente acuoso en presencia de una bicapa lipídica estará gobernada por 4 equilibrios correspondientes a las transiciones: secuencia desestructurada-hélice alfa en el medio acuoso (1), hélice en el medio acuoso-hélice TM (2), hélice TM-secuencia sin estructura en la membrana (3) y secuencia desestructurada en la membrana-secuencia sin estructura en agua (4). **B.** Asociación lateral de hélices TM. Adaptado de <http://engelman.csb.yale.edu/index.html>

Desestructurar una hélice dentro de la membrana es un proceso desfavorable, por la penalización energética que supone romper los enlaces de hidrógeno en un ambiente con una baja constante dieléctrica como es la membrana. Por lo tanto una secuencia hidrofóbica que ha sido insertada en la membrana como una hélice es energéticamente improbable que abandone la bicapa (por su composición basada en aminoácidos hidrofóbicos) o que pierda su estructura dentro de la membrana (por la exposición de los grupos polares CO y NH del esqueleto polipeptídico).

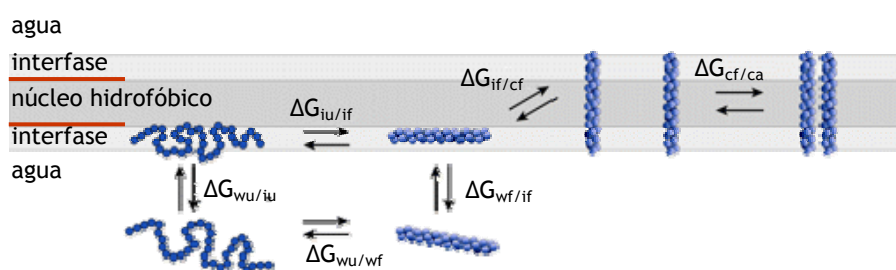
## Introducción

2. *Asociación lateral de hélices transmembrana.* La segunda parte del modelo de Popot y Engelman se centra en la tendencia de las hélices monoméricas para asociarse entre sí. La formación de un dímero entre dos hélices (asociación más simple que se puede producir en los haces de hélices alfa) provoca un aumento de las interacciones hélice-hélice y lípido-lípido y una disminución de interacciones hélice-lípido. La entropía de los lípidos aumenta tras la dimerización, mientras que la de las hélices disminuye. El equilibrio entre dímero-monómero estará gobernado por este componente entrópico y por el valor entálpico derivado de las interacciones específicas (lípido-lípido, hélice-hélice, hélice-lípido) del proceso (figura i.13 B). La interacción entre diferentes hélices TM de una misma proteína también estará gobernada por estos mismos factores.

Más recientemente la combinación del modelo de dos estados de Popot y Engelman (Popot & Engelman, 1990) y del esquema propuesto previamente por Jacobs y White (Jacobs & White, 1989a) ha conducido a proponer el modelo conocido como **modelo de cuatro estados** (figura i.14). Los experimentos realizados por Jacobs y White primero (Jacobs & White, 1986; Jacobs & White, 1987; Jacobs & White, 1989b) y más tarde por Wimley y White (Wimley et al, 1996; Wimley & White, 1996) en ambientes miméticos de membrana y membranas modelo sientan las bases de cuando, desde un punto de vista termodinámico, una secuencia de aminoácidos desplegada permanece soluble, se asocia a la interfase o se inserta en la membrana, estando la inserción acoplada necesariamente al plegamiento del péptido (Li & Deber, 1993; Li & Deber, 1994). Los factores identificados en estos trabajos como determinantes para la localización de un péptido son fundamentalmente su hidrofobicidad y su capacidad para adoptar una conformación en alfa hélice, estando ambos implícitos en la secuencia de aminoácidos.

Este modelo no representa el proceso natural de inserción y plegamiento de las proteínas de membrana pero proporciona una visión termodinámica del proceso de inserción (White & von Heijne, 2008) y permite entender en términos energéticos el proceso de inserción en bicapas de péptidos que espontáneamente particionan desde un ambiente acuoso a la membranas, como son algunas toxinas bacterianas.





**Figura i.14. Modelo de cuatro estados.** Una cadena polipeptídica puede particionar desde y hacia el agua (w), la interfase (i) o el núcleo hidrofóbico de la membrana (c). En cada uno de estos ambientes la cadena puede encontrarse desplegada (u) o plegada adoptando algún tipo de estructura secundaria que neutralice los enlaces de hidrógeno (f), siendo la inserción en membrana un proceso ligado al plegamiento. La localización de una secuencia peptídica dependerá de la variación en energía libre asociada a cada una de las transiciones entre los diferentes estados ( $\Delta G$  y los subíndices que indican conformación y la localización del péptido en los estados de partida y de destino). Adaptado de (Mackenzie, 2006).

### i.7.2 Requisitos para la inserción de un dominio helicoidal en la membrana

El principal determinante para que una secuencia se inserte en la membrana es su valor global de hidrofobicidad, a mayor grado de hidrofobicidad mayor tendencia a la inserción. Este concepto entra en conflicto con la visión que se tenía de los residuos con carga neta dentro de la membrana, considerados hasta hace poco como prohibidos en cuanto a su presencia en el núcleo hidrofóbico. Como se ha demostrado en los últimos años este tipo de aminoácidos no impide la inserción en la bicapa de una secuencia sino que la supedita a la hidrofobicidad total del segmento (MacCallum et al, 2008; Martínez-Gil et al, 2008). Un efecto similar se observa con aquellos aminoácidos con capacidad para impedir la formación de estructura secundaria, como puede ser la prolina (Nilsson et al, 1998). El caso de la prolina es más complejo ya que se ha visto en péptidos, basados en secuencias repetitivas de leucinas, que promueve la asociación superficial a la membrana (Caputo & London, 2003a; Caputo & London, 2003b).

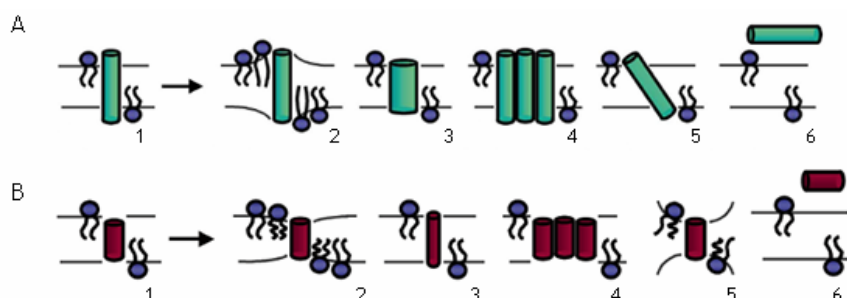
Una secuencia TM debe ser lo suficientemente larga para poder atravesar la bicapa (Chen & Kendall, 1995; Kuroiwa et al, 1991; Whitley et al, 1996) además de cumplir con los requisitos de hidrofobicidad y helicidad

## Introducción

descritos anteriormente. Dentro de unos límites una secuencia corta podrá insertarse si es lo suficientemente hidrofóbica, un péptido con una hidrofobicidad más baja necesitará una mayor longitud para insertarse en la membrana (Hessa et al, 2005; Hessa et al, 2007). Los valores concretos de longitud e hidrofobicidad requeridos para la inserción dependerán de la membrana en la que la secuencia se inserte y de la maquinaria o mecanismo de inserción empleado por la proteína. En el laboratorio del Profesor von Heijne se ha desarrollado recientemente una técnica, basada en un **mapeo por glicosilación**, que ha permitido estudiar todos estos factores (hidrofobicidad, helicidad, longitud de la secuencia etc.) en membranas del retículo endoplásmico (apartado ex.1.2) y obtener así la tendencia de cada aminoácido para insertarse en la membrana. Los resultados obtenidos con esta técnica se correlacionan sorprendentemente bien con la escala de octanol de Wimley y White (Wimley et al, 1996). Además, muestran que la posición relativa de los residuos hidrofóbicos dentro de una secuencia es un factor importante para la inserción de dicho fragmento en la membrana, fenómeno que hasta ahora no había sido descrito (Hessa et al, 2005).

Fragmentos hidrofóbicos de diferente longitud son capaces de insertarse en una misma bicapa, por lo tanto no siempre coincidirá el grosor de la región hidrofóbica de la membrana con la longitud de los fragmentos hidrofóbicos insertados en la bicapa. Se produce entonces un fenómeno conocido como **desajuste hidrofóbico** (*hydrophobic mismatch*) en el que o bien regiones hidrofóbicas de la proteína son expuestas al medio acuoso si el grosor de la membrana es insuficiente para acomodar el segmento hidrofóbico (desajuste positivo), o residuos polares son enterrados en la membrana si la región hidrofóbica del polipéptido no es suficientemente larga (desajuste negativo) (figura i.15) (Killian, 1998; Killian, 2003). En estas situaciones tanto los lípidos como las proteínas tendrán que adaptarse para minimizar la energía del sistema. Los lípidos pueden ajustar el grosor de la bicapa adoptando una disposición más o menos extendida en sus cadenas acílicas. Las proteínas por su parte pueden responder a este desajuste promoviendo la interacción entre hélices o alterando la conformación del esqueleto peptídico adoptando estructuras helicoidales más o menos alargadas. En los casos de desajuste positivo las hélices TM pueden adoptar una disposición inclinada (*tilt*), menos perpendicular al plano de la bicapa. Los residuos polares, en los casos de desajuste negativo pueden, dependiendo de su posición, “asomar” sus cadenas laterales fuera del

núcleo hidrofóbico de la membrana (zona I, sección i.6.1); fenómeno que se conoce como *snorkel* (Monne et al, 1998).



**Figura i.15. Desajuste hidrofóbico.** A. Adaptaciones de la membrana y la proteína para reducir el desajuste positivo (1), extensión de las cadenas acílicas (2), deformación del esqueleto peptídico (3), oligomerización (4), variación del grado de inclinación o *tilt* (5) y exclusión del péptido de la membrana (6). B. Adaptaciones de la membrana y la proteína para reducir el desajuste negativo (1), compresión de las cadenas acílicas (2), deformación del esqueleto peptídico (3), oligomerización (4), formación de fases no lamelares (5) y exclusión del péptido de la membrana (6). Adaptado de (de Planque & Killian, 2003).

## I.8 INSERCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

Tanto las proteínas integrales de membrana como aquellas solubles del espacio extracelular han de cruzar la membrana parcial o totalmente. Ambas emplean la misma maquinaria, conocida como **translocón**, para su inserción y transporte. El translocón es un complejo multiproteico localizado en la membrana del retículo. Consiste básicamente en un canal que atraviesa la bicapa lipídica, el cual cumple dos funciones, por un lado permite que las proteínas solubles del lumen atraviesen completamente la membrana del ER, y por otro, que los fragmentos TM de las proteínas integrales de membrana se introduzcan lateralmente en la bicapa.

El canal de translocación está formado por un complejo heterotrimérico conocido como **Sec61** en eucariontes y **SecY** en arqueas y procariontes (Van den Berg et al, 2004). Las tres subunidades que lo forman se conocen como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  o *SecY*, *SecG* y *SecE* en eubacterias. Las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  están bastante conservadas entre los tres reinos siendo

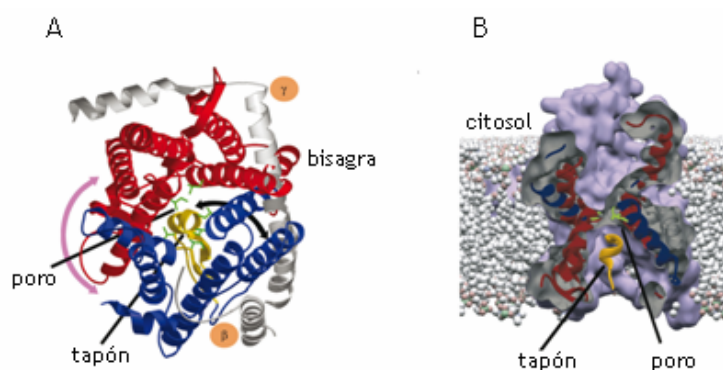
## Introducción

ambas imprescindibles para el funcionamiento del canal y la supervivencia de la célula. Las subunidades  $\beta$  en cambio muestran homología únicamente entre eucariontes y arqueas pero no con bacterias, además de no ser esenciales para la función del translocón.

La subunidad  $\alpha$  forma el poro del canal (Görlich & Rapoport, 1993; Mothes et al, 1994) cuyo interior es acuoso (Crowley et al, 1994). Visto desde el citosol el canal tiene una forma cuadrada (figura i.16 A), la subunidad  $\alpha$ , formada por 10 fragmentos TM, está dividida en dos partes claramente diferenciadas que se encuentran unidas por un lazo. Éste actúa a modo bisagra entre las dos partes lo que permite generar una apertura lateral en el canal hacia la membrana. La subunidad  $\gamma$  se une a la subunidad  $\alpha$  por el lado opuesto a la apertura lateral a modo de refuerzo del lazo que actúa como bisagra. La subunidad  $\beta$  en cambio sólo hace contacto de manera periférica con uno de los lados de  $\alpha$  (figura i.16 A). En una visión lateral (perpendicular a la membrana) Sec61  $\alpha$  muestra forma de un reloj de arena, presentando su punto más estrecho en el centro de la bicapa. Este estrechamiento está formado por un anillo de residuos aromáticos que evita el flujo incontrolado de moléculas de un lado a otro de la membrana. El lado del citoplasma de esta estructura en forma de reloj de arena, queda vacío mientras que el luminal está ocupado cuando el canal se encuentra en su conformación cerrada por una corta hélice que actúa a modo de tapón (figura i.16 B). El canal tiene por lo tanto la capacidad de abrirse y cerrarse en dos direcciones, perpendicular al plano de la membrana para permitir la translocación de proteínas solubles y lateralmente hacia la membrana para permitir el paso de los dominios TM a la bicapa lipídica.

El diámetro del poro en su estado cerrado impide el paso de una cadena polipeptídica, es necesaria por tanto la apertura del canal para que la translocación sea posible. El tamaño máximo del poro en su estado abierto se ha estimado entre 15 – 20 Å, espacio suficiente para el paso de una hélice alfa (Kowarik et al, 2002).

El poro está formado por un monómero de Sec61 o SecY, sin embargo hay resultados que indican que la translocación podría estar mediada por oligómeros de Sec61/SecY (Osborne & Rapoport, 2007), aunque se postula que únicamente una copia de Sec61/SecY estaría activa en cada oligómero (Skach, 2007).



**Figura i.16. Estructura de SecY/Sec61.** Representaciones de la estructura de rayos X del complejo SecY de *Methanococcus jannaschii*. **A.** Las hélices 1-5 y 6-10 de la subunidad  $\alpha$  (en rojo y azul respectivamente) pueden crear una apertura lateral hacia la membrana (flecha rosa) para permitir que los dominios suficientemente hidrofóbicos se inserten en la bicapa. Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  se muestran en gris. En su estado cerrado el canal presenta un tapón (hélice amarilla) en el lado luminal. **B.** Visión transversal del canal del translocón formado por SecY (rojo y azul) donde se aprecia la forma de reloj de arena y el estrechamiento central formado por un anillo hidrofóbico (verde). Adaptado de (Rapoport, 2007).

### i.8.1 Translocación co-traduccional

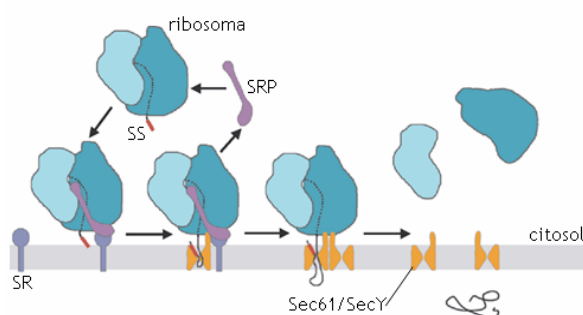
Este mecanismo, en el cual la translocación e inserción de la proteína en la membrana se produce acoplado a la traducción, es el empleado por las proteínas de secreción y por la mayoría de las proteínas de membrana para alcanzar su destino. La síntesis de estos dos grupos de proteínas comienza en el citoplasma. Las proteínas que han de ser dirigidas hacia el translocón presentan en su extremo N-t una **secuencia señal** (SS), que consiste en uno o más residuos cargados seguidos de entre 12 y 20 aminoácidos hidrofóbicos. Cuando esta región emerge del ribosoma es reconocida por la **partícula de reconocimiento de la secuencia señal** (SRP) (Walter & Blobel, 1981a; Walter & Blobel, 1981b; Walter et al, 1981), la cual es capaz de detener momentáneamente la traducción y dirigir el complejo (mRNA-ribosoma-polipéptido naciente) al translocón (figura i.17). En un primer paso el complejo es direccionado a la membrana del ER, proceso guiado por la afinidad entre la SRP y su receptor (SR), el cual se encuentra en las

## Introducción

proximidades del translocón. A continuación y una vez anclado a la membrana a través del SR, el complejo, es transferido al translocón (Halic & Beckmann, 2005) (figura i.17).

Algunas proteínas de membrana carecen de SS, en estos casos la SRP es capaz de reconocer el primer fragmento TM, el cual actuará como una señal de direccionamiento, que no es eliminada por la peptidasa del péptido señal, y como secuencia de anclaje a la membrana.

La SRP es un complejo ribonucleoproteico formado por 7 subunidades proteicas (SRP 72, 68, 54, 19, 14 y 9) y una molécula de RNA 7S (Andrews et al, 1985). El SR está compuesto por dos proteínas, SR $\alpha$  proteína periférica de membrana capaz de interactuar con la SRP y SR $\beta$ , proteína integral de membrana localizada en la membrana del ER. Es la unión entre la SRP y la SS la que aumenta la afinidad de la SRP por su receptor y lo que dispara el proceso de direccionamiento.



**Figura i.17. Inserción co-traduccional.** La SRP, tras reconocer la secuencia señal, dirige el ribosoma con la cadena nascente y el mRNA al canal del translocón mediante la interacción con su receptor (SR). Es entonces, una vez se ha unido el ribosoma al translocón cuando la SRP se libera y la traducción se reinicia. La cadena nascente es ahora capaz de pasar a través del translocón. Adaptado de (Rapoport, 2007).

Una vez el complejo formado por la SRP, el SR y el ribosoma con la cadena nascente se une al translocón la traducción se reinicia y la SRP se libera (con gasto de energía), pudiendo reanudar un nuevo ciclo de direccionamiento (figura i.17). La cadena nascente entra directamente desde

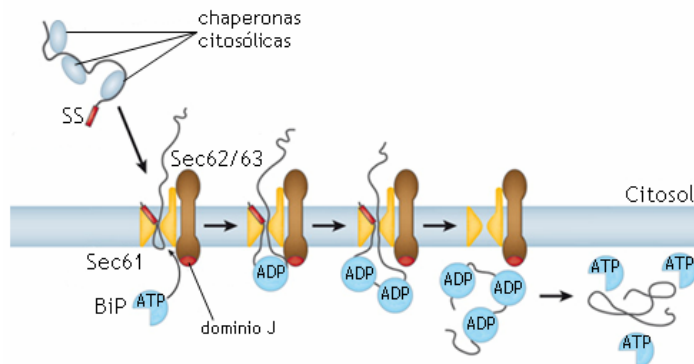
el túnel del ribosoma al canal del translocón, el cual ahora debido a la interacción con el ribosoma se encuentra abierto y permite el paso del polipéptido al otro lado de la membrana. La hidrólisis de GTP es necesaria para la elongación de la cadena peptídica pero el paso a través del canal no requiere energía.

### **i.8.2 Translocación post-traduccional**

En algunos casos las proteínas son translocadas una vez su síntesis ha finalizado. Generalmente esto ocurre en proteínas solubles translocadas al lumen del ER que tienen unas SS moderadamente hidrofóbicas no reconocidas por la SRP (Huber et al, 2005a). Esta vía de translocación requiere que las proteínas permanezcan desplegadas una vez terminada su traducción (Huber et al, 2005b), la presencia de chaperonas citosólicas que impidan el plegamiento es por tanto imprescindible. En la translocación post-traduccional existen diferencias en los mecanismos empleados por eucariontes y procariontes.

Dado que en esta ruta las proteínas han sido sintetizadas totalmente antes de la inserción, el ribosoma no interactúa con el complejo Sec61. El direccionamiento de las proteínas recién sintetizadas hasta el canal del translocón se debe en eucariontes a la afinidad de las chaperonas citosólicas por el complejo de membrana **Sec62/Sec63** (figura i.18), junto a Sec71 en el caso de levaduras. La cadena polipeptídica con las chaperonas que evitan su plegamiento, se une al complejo Sec61-Sec62/Sec63, unión que produce la liberación de las chaperonas. Una vez dentro del canal, el polipéptido puede moverse en cualquier dirección pero su unión con la proteína del lumen **BiP** impide el movimiento retrógrado hacia el citosol. BiP en su estado activo (con ATP), presenta un dominio con capacidad de unión a cadenas polipeptídicas desplegadas abierto, la interacción entre BiP y el **dominio J** de Sec63 activa la hidrólisis del ATP, lo que produce un cambio conformacional en BiP, la cual cierra su dominio de unión a proteínas con la cadena que está siendo translocada atrapada en su interior. Es este fenómeno el que impide que la cadena polipeptídica pueda regresar al citosol en un movimiento retrógrado altamente contraproducente para la célula. Cuando se genere suficiente espacio, debido al movimiento hacia el lumen del polipéptido translocado, otra molécula de BiP-ATP se podrá unir, repitiéndose el proceso hasta que toda la proteína haya sido translocada (Misselwitz et al,

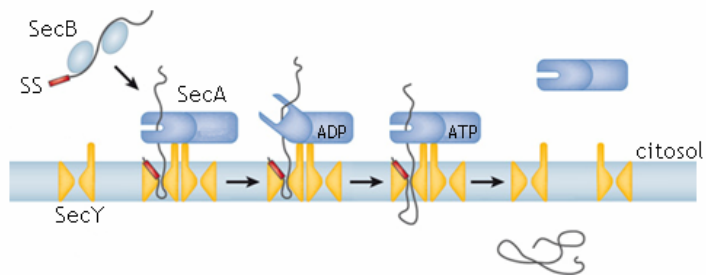
1998). Finalmente el intercambio de ADP por ATP hace que BiP se libere del polipéptido que acaba de translocarse.



**Figura i.18. Translocación post-traduccional en eucariontes.** La unión de BiP, tras la hidrólisis de ATP, a la cadena polipeptídica que está siendo translocada evita que ésta vuelva al citosol. El polipéptido es mantenido en su estado desplegado en el citosol mediante la unión de chaperonas. El complejo Sec61 se indica en amarillo, Sec62/63 en marrón con el dominio J en rojo. Adaptado de (Rapoport, 2007).

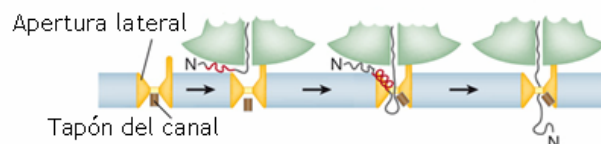
En procariontes la chaperona citosólica **SecB** es la encargada de unir la cadena polipeptídica que va a ser translocada y dirigirla al complejo formado por SecY y **SecA**. SecA es una ATPasa acoplada a la cara citosólica de SecY que consta de dos subunidades (*NBF1* y *NBF2*). Una vez el dominio NBF2 une el polipéptido que va a ser translocado el movimiento relativo de NBF2 sobre NBF1 empuja la cadena a través del canal formado por SecY (figura i.19). En presencia de ADP NBF2 se encuentra en su estado abierto, es el intercambio de ADP por ATP lo que produce el cambio conformacional en NBF2 de abierto a cerrado y el movimiento relativo de NBF2 sobre NBF1 que “empuja” el polipéptido a través del translocón. La hidrólisis de ATP produce que NBF2 retorne a su estado abierto para poder repetir el ciclo hasta que la proteína sea completamente translocada. Recientemente ha sido resuelta la estructura del complejo formado por SecA y SecY (Zimmer et al, 2008), estructura que ayuda a comprender este mecanismo de translocación.





**Figura i.19. Translocación post-traduccional en bacterias.** Es el motor formado por las dos subunidades de SecA el que empuja la cadena polipeptídica a través de SecY empleando ATP como fuente de energía. Una vez la translocación ha finalizado el complejo se desensambla para poder reanudar un nuevo ciclo. Adaptado de (Rapoport, 2007).

Todos los tipos de translocación (co- o post-traduccional) comienzan con la inserción del polipéptido en forma de lazo dentro del canal de translocación, con el extremo N-t apuntando hacia el citosol. A continuación la SS (segmento hidrofóbico) se intercala en la apertura lateral del canal sin llegar a entrar en la membrana (Plath et al, 1998) (figura i.20). La unión de la SS, según los datos obtenidos con simulaciones por dinámica molecular, provoca la apertura del tapón del Sec61 y permite que el polipéptido atraviese completamente el canal (Gumbart & Schulten, 2006). Durante el proceso de translocación la secuencia señal queda retenida en la apertura lateral hasta que es cortada por la peptidasa de la SS, enzima acoplado al complejo de translocación. Una vez la translocación haya finalizado el tapón probablemente regresa a su posición bloqueando el canal.



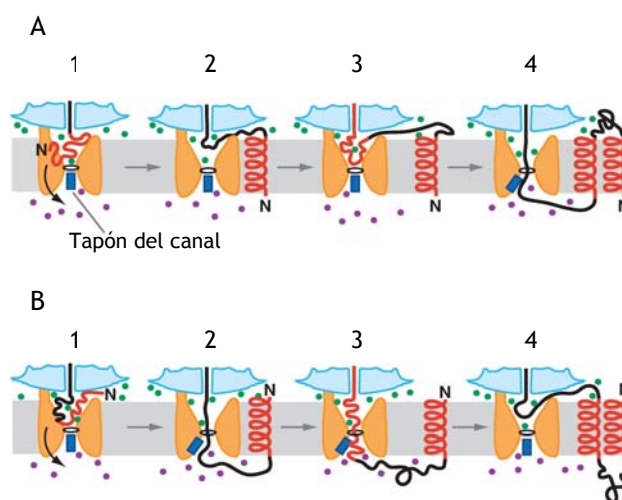
**Figura i.20. Inicio de la translocación co-traduccional.** La unión del ribosoma (verde) a Sec61 (naranja) dilata en canal acuoso central lo que permite la entrada de la secuencia señal (rojo) con su N-t orientado al citosol. La unión de la SS abrirá completamente el poro permitiendo la translocación. La SS queda retenida en la apertura lateral para posteriormente ser eliminada. Adaptado de (Rapoport, 2007).

### **i.8.3 Inserción de proteínas en la membrana del ER**

A medida que las proteínas de membrana atraviesan el canal del translocón los segmentos TM son insertados en el interior de la bicapa lipídica por medio de la apertura lateral del canal. Se ha postulado que una vez se ha producido la apertura del tapón del canal, la apertura lateral del translocón está constantemente abriéndose y cerrándose, lo que expone a las regiones de las proteínas que en ese momento se encuentran en el canal (acuoso) del translocón al medio hidrofóbico que supone la membrana. Aquellos segmentos lo suficientemente hidrofóbicos se dirigirán a la membrana a través de la apertura lateral cuando se encuentren en la posición adecuada dentro del canal. El tamaño de esta apertura indica que los segmentos TM salen del canal de uno en uno (Heinrich & Rapoport, 2003) o en parejas (Sauri et al, 2005) aunque también existen evidencias de la inserción de varias hélices en bloque (Sadlish et al, 2005). En este sentido, el complejo del translocón permitiría interacciones entre diferentes dominios TM de una misma proteína antes que el proceso de integración haya finalizado completamente, lo cual facilita la inserción en la bicapa de segmentos que sin estas interacciones no serían capaces de integrarse (White & von Heijne, 2008).

Las regiones solubles entre los dominios TM saldrán forzosamente del canal de Sec61/SecY alternativamente por el extremo luminal y por el lado citosólico ([figura i.21 Ay B](#)). En este último caso si la inserción es cotraduccional la cadena polipeptídica debe salir a través de un hueco entre el ribosoma y el translocón, dicha apertura ha podido ser visualizada por microscopia electrónica (Menetret et al, 2005).

En aquellas proteínas de membrana que carezcan de SS (la cual siempre orienta su extremo N-t al citosol) el primer fragmento TM puede orientar su extremo N-t tanto hacia el citosol como hacia el lumen, dependiendo de la secuencia de aminoácidos, lo que determinará en gran medida la topología global de la proteína ([figura i.21 A frente a B](#)).



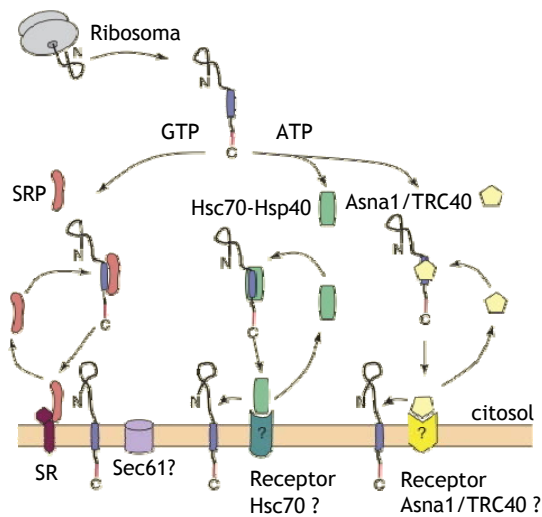
**Figura i.21. Integración de proteínas de membrana.** **A.** Integración de proteínas de membrana a través del translocón cuando el extremo N-t de la proteína se orienta hacia el lumen/exterior. Al igual que en la translocación de proteínas solubles el tapón del canal sufre un cambio conformacional con la entrada de la cadena nascente en el canal de Sec61/SecY (1). A medida que vayan apareciendo regiones hidrofóbicas éstas se irán insertando en la bicapa (2 y 4). Los dominios solubles asomarán por el lado luminal o por el citosólico para lo cual tendrán que aprovechar una apertura entre Sec61/SecY (naranja) y el ribosoma (azul) (2 y 3). **B** Si el primer fragmento TM se orienta como la SS el primer lazo quedará expuesto necesariamente en el lado luminal. Adaptado de (Osborne et al, 2005).

#### i.8.4 Anclaje a la membrana a través del extremo C-t

En mamíferos la inserción post-traduccional en la bicapa lipídica es exclusiva de las proteínas ancladas a la membrana por el extremo C-t. Estas son un tipo especializado de proteínas de membrana caracterizadas por presentar su dominio de anclaje a la membrana al final de la secuencia de aminoácidos, lo que las obliga a insertarse en la bicapa de manera post-traduccional y con el extremo N-t en el citosol. Al igual que el resto de proteínas de membrana la mayoría de las proteínas ancladas por el C-t se integran en primer lugar en el ER para luego dirigirse a su destino final por medio de la vía de secreción. Actualmente se dispone de poca información relativa al direccionamiento a la membrana del ER de estas proteínas, pero parecen existir dos grandes vías, una dependiente de ATP y otra de GTP (figura i.22). En esta última participa la SRP y su receptor, aunque se

## Introducción

desconoce si Sec61 esta involucrado en la inserción. Mientras que en la vía que depende de ATP existirían dos rutas, una mediada por las chaperonas **Asna1/TRC40** y otra por **Hsc70-Hsp40** (Abell et al, 2007; Rabu & High, 2007). Se ha postulado la existencia de receptores de membrana para ambos complejos pero ninguno de ellos ha sido descrito todavía.

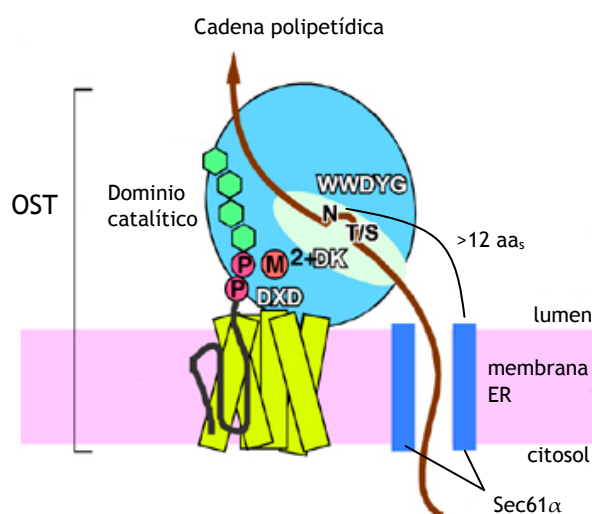


**Figura i.22. Integración en membrana de las proteínas ancladas por el extremo C-t.** Hasta la fecha se han identificados tres rutas para la integración de las proteínas de membrana que presenta un único dominio hidrofóbico localizado en el extremo C-t basadas en la SRP, (rojo) Hsc70-Hsc40 (verde) y Asna1/TRC40 (amarillo). Adaptado de (Rabu & High, 2007).

### i.8.5 Componentes del translocón

La maquinaria de translocación o translocón está formada en eucariontes por otras proteínas, además de Sec61, que facilitan la translocación y regulan el proceso. Entre estas se encuentra la **peptidasa de la secuencia señal**. La eliminación de la SS se debe producir antes de que la proteína adopte su estructura final, ya que su presencia podría alterar de algún modo el plegamiento. El complejo de la peptidasa está anclado a la membrana y formado por cinco subunidades dos de las cuales presentan actividad proteolítica mientras que el resto desempeñan funciones reguladoras (Evans

et al, 1986; Shelness et al, 1993). Otra de las proteínas que forman parte del complejo del translocón es la **Oligosacaril-Transferasa (OST)** (Nilsson et al, 2003), este complejo enzimático es responsable de la incorporación de restos de azúcar a secuencias dianas de los dominios polipeptídicos translocados al lumen del ER. Estas secuencias consenso de glicosilación están constituidas por tres aminoácidos **Asn-X-Ser/Thr**, siendo X cualquier aminoácido excepto prolina. La adición de residuos de azúcar en la Asn de la secuencia diana se produce al emerger la cadena naciente del translocón, dado que el polipéptido naciente avanza a través del centro catalítico de la enzima (figura i.23) (Igura et al, 2008). Se requiere una distancia mínima de 12 aminoácidos entre el canal de Sec61 y la primera Asn que puede ser marcada (Li et al, 2008; Nilsson & von Heijne, 2000).



**Figura i.23. Oligosacaril-transferasa.** Representación esquemática de la OST. La cadena naciente (línea marrón) sale del canal del translocón (azul) y se introduce en el dominio catalítico de la OST (azul claro). La enzima presenta un surco hidrofóbico (blanco) dentro de su dominio catalítico donde los residuos de azúcar (hexágonos verdes) son transferidos a la Asn de las dianas de glicosilación. Los aminoácidos clave dentro del sitio activo de la enzima se encuentran conservados. Adaptado de (Igura et al, 2008).

Uno de los componentes que se han identificado asociado al translocón es la proteína **TRAM** (*Translocating chain-associating membrane protein*) (Görlich et al, 1992). Esta es una proteína integral de membrana que

## Introducción

participa en la translocación de proteínas de secreción (Hegde et al, 1998). También se ha descrito su participación en el proceso de integración de algunas proteínas de membrana (Do et al, 1996), en estos casos se ha propuesto que podría mediar la partición a la bicapa lipídica de fragmentos poco hidrofóbicos que requieran de interacciones proteína-proteína previas a su integración (Heinrich et al, 2000; Voigt et al, 1996). Otra de las proteínas asociada al translocón es **TRAP** (*Translocon-associated protein*), aunque se desconoce su función concreta se ha observado su participación en el proceso de translocación co-traducciona (Menetret et al, 2008).

### i.8.6 Translocación en mitocondrias

El genoma mitocondrial codifica para un número reducido de proteínas es por eso que la mayoría de las proteínas mitocondriales son importadas a la mitocondria post-traducciona. Las mitocondrias presentan dos membranas (una externa y otra interna). Las proteínas de la matriz mitocondrial deben por lo tanto atravesar estas dos membranas antes de alcanzar su destino final. Estas proteínas (sintetizadas en el citoplasma) cuentan con una secuencia señal específica que las dirige a la membrana externa mitocondrial. El transporte a través de las membranas externa e interna se realiza por dos complejos translocasa denominados **TOM** y **TIM** respectivamente (Wickner & Schekman, 2005). Los cuales también participan en la integración de las proteínas integrales en sus respectivas membranas. En la membrana interna mitocondrial existe otra translocasa implicada en procesos de translocación de proteínas integrales de la membrana interna conocida como **Oxa1p**, la cual es a su vez una proteína integral de membrana con cinco fragmentos TM helicoidales. Se ha visto que Oxa1p interacciona con cadenas nacientes de proteínas de membrana codificadas por el genoma mitocondrial y con proteínas completas del genoma nuclear (Szyrach et al, 2003).

### i.8.7 Translocación en cloroplastos

Al igual que en mitocondrias la translocación de proteínas a través de las membranas del cloroplasto se produce de forma post-traducciona, dado que la mayoría de las proteínas son sintetizadas en el citoplasma y posteriormente importadas al interior del orgánulo. En las membranas

externa e interna existen dos complejos proteicos encargados de la translocación análogos a TOM y TIM en mitocondrias y conocidos como **TOC** y **TIC**. En el interior de los cloroplastos se encuentran los tilacoides. Para la translocación e inserción de proteínas en la membrana tilacoidal se han descrito al menos cuatro sistemas. (1) Inserción espontánea mediada por el potencial electroquímico (Mant et al, 1995). (2) En la membrana del tilacoide se puede encontrar un complejo homólogo al translocón de bacterias implicado en la inserción co-traducciona de las proteínas codificadas en el genoma del cloroplasto y post-traducciona de aquellas proteínas codificadas en el genoma nuclear. (3) La translocasa **Alb3** realizaría en la membrana tilacoidal un papel homólogo al de Oxa1p en la membrana mitocondrial externa (Woolhead et al, 2001). (4) El complejo **TAT** es capaz de dirigir la translocación de proteínas ya plegadas al interior de los tilacoides (Robinson & Bolhuis, 2004).

### i.8.8 Translocación en bacterias

En bacterias *Gram-* además de las rutas ya descritas basadas en SecY (implicada en la translocación e inserción co-traducciona) y SecA/SecB (translocación post-traducciona), se han descrito otras rutas alternativas de translocación.

**YidC** es una proteína asociada al canal de SecY, se han propuesto al menos dos funciones para YidC, una análoga a la que realiza TRAM en eucariontes, en la que facilitaría la translocación a la membrana de ciertos fragmentos TM (van der Laan et al, 2001), y otra en la que YidC ejercería como translocasa de manera independiente de SecY (Serek et al, 2004). Esta función requeriría que la proteína se ensamblara como homo o hetero-oligómeros independientes del translocón (de Gier & Luirink, 2003). Existe otro sistema implicado en la secreción de proteínas plegadas al periplasma. El sistema **TAT**, análogo al de cloroplastos, reconoce un motivo de dos Arg (R-R) tanto en proteínas desplegadas como en aquellas que ya están plegadas (siempre y cuando en estos casos el motivo R-R permanezca accesible). El número de subunidades del complejo TAT puede variar, de manera que el tamaño del poro que se forma puede adaptarse para el transporte de grandes proteínas ya plegadas, incluso de oligómeros (Gohlke et al, 2005).

## **I.9 TOPOGÉNESIS DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA**

### **i.9.1 Clasificación de proteínas integrales de membrana según su topología**

La correcta topología de una proteína de membrana (localización relativa de sus extremos N-t y C-t) es fundamental para poder llevar a cabo su función biológica. Generalmente la topología que adquiere una proteína es única, aunque se han identificado casos en los que una misma secuencia es capaz de insertarse en la membrana con dos topologías opuestas (Rapp et al, 2006; Rapp et al, 2007). Atendiendo a su topología se pueden identificar cuatro grandes grupos de proteínas de membrana (Goder & Spiess, 2001).

Las proteínas **Tipo I** son aquellas que presentan SS hidrolizable, por lo tanto tienen obligatoriamente su extremo N-t en el lado extracitoplasmático (apartado i.8.3). Existen excepciones en algunos casos de proteínas con SS y un corto lazo hasta el primer dominio TM, en las que se ha observado una inversión de la topología una vez la SS ha sido cortada (Stewart et al, 2001). Las **Tipo II** y **Tipo III** son proteínas carentes de SS en las que el primer fragmento TM se orienta con su extremo N-t hacia el citosol o hacia el lumen respectivamente ([figura i.24](#)). Se asume que en las proteínas de membrana más complejas, aquellas que atraviesan la bicapa más de una vez (también conocidas como politópicas), es el primer fragmento hidrofóbico el responsable del direccionamiento a membranas de la proteína así como de establecer su topología global. Además de estos tres grupos se podría considerar un cuarto (**tipo IV**) formado por las proteínas ancladas a la membrana por su extremo C-t y cuyo mecanismo de inserción localizará necesariamente el extremo N-t en el citosol.

### **i.9.2 Determinantes topológicos**

Existen diferentes factores que determinan la topología de una proteína carente de SS, entre los que hay que destacar las cargas flanqueantes al los fragmentos TM, el plegamiento del dominio N-t y la hidrofobicidad del dominio TM.



	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Ancladas C-t
exterior				
topología final				
citoplasma				
ejemplos	Glicoforina Receptor LDL	Receptor transferrina	Citocromos P-450	Sinaptobrevina citocromo b3

Figura i.24. Clasificación de proteínas de membrana según su topología. Clasificación basada en (Goder & Spiess, 2001) que muestra los cuatro grandes grupos de proteínas de membrana y ejemplos de cada uno de ellos.

### Aminoácidos cargados

El determinante topológico más estudiado hasta la fecha es la distribución de aminoácidos cargados en las regiones flanqueantes a los fragmentos TM. Los residuos cargados positivamente (Arg, Lys) se localizan preferentemente en el lado citosólico de la membrana, es lo que se conoce como *positive inside rule* (von Heijne, 1986). Esta hipótesis se estableció primero para proteínas de origen bacteriano (Andersson & von Heijne, 1994) pero posteriormente se observó que las proteínas de membrana eucariotas también obedecen a este determinante topológico (Gafvelin et al, 1997). En bacterias el extremo que presente mayor número de cargas positivas se localizará en el citosol, mientras que en eucariontes es el balance de cargas (teniendo en cuenta positivas y negativas) entre las regiones adyacentes al primer dominio hidrofóbico lo que determinará la topología de la proteína.

En procariontes se ha propuesto que este efecto se debe a la interacción entre los aminoácidos cargados positivamente y los lípidos con carga negativa que abundan en la monocapa interna de la membrana (van Klompenburg et al, 1997) (apartado i.6.1) y también a la existencia de un potencial de membrana negativo intracelular (*proton motive force*). En eucariotas sin embargo se ha postulado que los residuos cargados positivamente podrían interactuar con cargas negativas en el lado citoplasmático del translocón y los aminoácidos con carga neta negativa con

## *Introducción*

residuos básicos situados en lado luminal de Sec61 $\alpha$  (Higy et al, 2004). Gracias a la estructura del canal de SecY se han identificado residuos cargados que podrían realizar este papel.

### **Plegamiento del dominio N-t**

Las secuencias situadas en el extremo N-t del primer fragmento hidrofóbico, en aquellas proteínas carentes de SS, están expuestas al citosol antes de que el primer fragmento TM, que realiza la función de secuencia de direccionamiento, emerja del ribosoma. Es posible entonces que estas secuencias adquieran un grado de estructura terciaria lo suficientemente voluminoso como para que impida su translocación, ya que secuencias plegadas no pueden ser translocadas a través del canal Sec61/SecY (Denzer et al, 1995). Es el plegamiento y no la longitud en este caso lo que impide el paso por el canal. Las proteínas tipo III con un largo extremo N-t deben por lo tanto mantener desplegada su secuencia mediante chaperonas citosólicas para permitir su translocación.

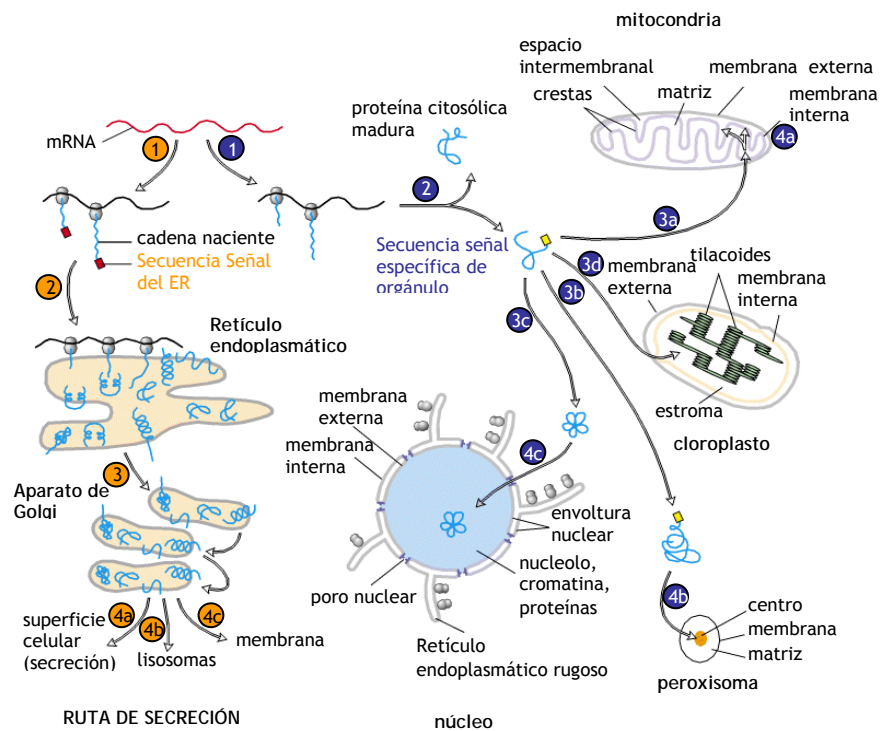
### **Hidrofobicidad del dominio transmembrana**

Existen evidencias experimentales que muestran que fragmentos TM altamente hidrofóbicos orientan su extremo N-t hacia el lumen (Tipo I) mientras que aquellos TM con una hidrofobicidad moderada lo harán hacia el citosol (Tipo II) (Goder & Spiess, 2001). La explicación para este fenómeno es todavía desconocida a pesar de que se han determinado las estructuras tanto del translocón como de la SRP y su receptor (SR). Se ha propuesto que el movimiento de apertura lateral del translocón Sec61/SecY permitiría la inserción rápida en la bicapa lipídica de los fragmentos TM más hidrofóbicos con una orientación N-t hacia el lumen, mientras que secuencias menos hidrofóbicas no sería insertadas con tanta facilidad por lo que permanecerían más tiempo en el canal del translocón permitiendo su inversión topológica y orientando su extremo N-t al citosol (Goder & Spiess, 2001).

## **I.10 DIRECCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA**

En eucariontes la mayoría de las proteínas de membrana que se insertan de manera co-traduccional lo hacen en la membrana del ER y posteriormente

alcanzan el orgánulo donde desempeñan su función. El direccionamiento a todos estos orgánulos depende de señales de direccionamiento específicas de cada orgánulo (figura i.25).



**Figura i.25. Direccionamiento de proteínas codificadas en el genoma nuclear.** El mRNA es traducido por los ribosomas citosólicos (1). Si la proteína ha de entrar en la ruta de secreción (ruta marcada en naranja) será dirigida al ER gracias a la secuencia señal del ER (2). Una vez tras la traducción se ha completado la proteína pasará al Golgi (3) desde donde alcanzará su destino final (4a, 4b, 4c). Tras la síntesis de las proteínas carentes de secuencia señal para el ER (ruta marcada en azul) éstas son liberadas al citosol (2). Aquellas que presenten una secuencia señal específica de orgánulo serán incorporadas a la mitocondria (3a), el cloroplasto (3d), el peroxisoma (3b) o el núcleo (3c). Las proteínas de mitocondrias y cloroplastos han de atravesar las membranas externa e interna para alcanzar la matriz o el estroma, respectivamente. Las proteínas del peroxisoma son translocadas al interior del orgánulo completamente plegadas (4b). Las proteínas nucleares lo hacen formando generalmente complejos ribonucleoproteicos (4c). Adaptado de (Lodish, 2000).

# APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL

## Ex.1 IDENTIFICACIÓN DE DOMINIOS TRANSMEMBRANA

### ex.1.1 Predicción de fragmentos transmembrana

Actualmente se dispone de un elevado número de genomas secuenciados, el análisis del conjunto de las ORFs identificadas nos indica que aproximadamente el 25% de dichas secuencias, independientemente del organismo al que pertenezcan, corresponden a proteínas de membrana (Krogh et al, 2001).

Las proteínas de membrana participan en procesos cruciales para la supervivencia celular (señalización, transporte a través de la membrana, reconocimiento celular, generación de energía, etc.). La industria farmacéutica se encuentra especialmente interesada en estas proteínas ya que se ha demostrado que numerosos receptores de membrana pueden ser empleados como potentes dianas terapéuticas (Chen et al, 2002), de hecho más del 50% de los fármacos actuales van dirigidos a este tipo de proteínas (Cuthbertson et al, 2005). A pesar de la importancia de las proteínas de membrana únicamente el 1.5% de las estructuras depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB) (incluyendo las estructuras redundantes) corresponde a este tipo de proteínas. Esto se debe, fundamentalmente, a las dificultades técnicas que presenta el trabajo con este tipo de proteínas, lo que convierte a todos aquellos métodos computacionales que nos permitan obtener modelos estructurales de las proteínas de membrana en una gran herramienta de trabajo, tanto por los propios resultados que ofrecen como por servir de punto de partida para el diseño de futuros experimentos.

Históricamente se ha considerado que la predicción de dominios TM debería de ser un proceso relativamente sencillo, debido a las fuertes restricciones que impone la membrana sobre la composición de aminoácidos en los dominios insertados en la bicapa y sobre la estructura secundaria que éstos pueden adoptar<sup>1</sup>. Actualmente, el incremento de estructuras de proteínas de membrana depositadas en el PDB muestra que existe una gran variabilidad en las regiones TM, lo que dificulta la identificación de los dominios TM.

<sup>1</sup> La mayoría de los programas de predicción de regiones TM están diseñados únicamente para la identificación de dominios helicoidales, por ser estos los más abundantes, y no para la detección de regiones estructuradas en hojas beta.

### *Aproximación experimental*

Existen dos grandes tipos de métodos para la identificación de dominios TM. Las primeras aproximaciones, más simplistas, basadas en la identificación de regiones de entre 15 y 30 aminoácidos donde predominen los residuos hidrofóbicos (Kyte & Doolittle, 1982). A medida que se han ido obteniendo más datos experimentales, las reglas que definen qué aminoácidos son permitidos en las membranas se han ido refinando (ej. preferencia de los aminoácidos aromáticos por la zona de interfase de las bicapas (Landolt-Marticorena et al, 1993) o la mayor incidencia del efecto del *snorkel* en el extremo N-t de los dominios TM (Chamberlain et al, 2004) (apartado i.7.2)) y con ellas los métodos de predicción. Estos métodos constan de 4 pasos. (1) A cada aminoácido se le otorga un valor según su tendencia a localizarse en la membrana. Dicho valor puede proceder de las características físico-químicas de los aminoácidos (ej. coeficiente de reparto entre agua y octanol) (Wimley & White, 1996) o de valores estadísticos, basados en la abundancia de los diferentes aminoácidos en las regiones TM de proteínas cuya estructura ha sido determinada por difracción de rayos X. A esta serie de valores se la conoce como **escala de propensión**. (2) Representación de los valores de propensión para cada aminoácido de la secuencia problema. (3) Suavizado de la gráfica mediante la representación del valor medio de una ventana de  $n$  residuos. Esta ventana se irá desplazando para obtener valores suavizados para toda la secuencia. (4) Identificación como región TM de aquellos segmentos de la gráfica suavizada que superen un determinado valor umbral, establecido previamente por el usuario (Punta et al, 2007).

Los métodos de predicción actuales se basan en modelos ocultos de Markov (*Hidden Markov Models*, HMMs) o en sistemas de redes neurales (*Neural Networks*, NNs). En estos últimos métodos se suceden dos procesos; en el primero se realiza una representación suavizada de propensión (análoga a la explicada anteriormente) y en el segundo se repite el proceso tomando como valores de entrada los generados en el anterior paso. Esta técnica aumenta la sensibilidad y permite la detección de patrones sutiles dentro de la región hidrofóbica.

Los HMMs fueron desarrollados a finales de los 60, pero no fue hasta la década de los 90 cuando se aplicaron a la biología. Desde su introducción los programas de predicción que emplean algoritmos basados

en sistemas de HMMs han probado ser los más exitosos en la detección de regiones TM.

En un sistema HMMs hay una serie de **variables observables** (en este caso la secuencia de aminoácidos) que depende de una secuencia de **estados ocultos** (dominio soluble transmembrana etc.). Mediante la observación de las variables observables a lo largo de una secuencia (temporal o física) es posible determinar a qué estado oculto pertenece cada una de estas variables si conocemos las reglas que dominan el proceso (de: [http://www.comp.leeds.ac.uk/roger/HiddenMarkovModels/html\\_dev/main.html](http://www.comp.leeds.ac.uk/roger/HiddenMarkovModels/html_dev/main.html)). En un HMMs existen por lo tanto dos series de estados y tres series probabilísticas:

*Estado oculto.* Verdadero estado del sistema el cual puede ser descrito por un modelo de Markov de primer orden<sup>1</sup>.

*Estado observable.* Estados del proceso que son “visibles”; su naturaleza depende del estado oculto.

*Vector  $\pi$ .* Probabilidad de encontrarse en un determinado estado oculto a tiempo  $t = 1$ .

*Matriz de transición de estado.* Probabilidad de encontrarse en uno de los estados ocultos dado el estado anterior.

*Matriz de confusión.* Probabilidad de observar uno de los estados observable cuando el proceso se encuentra en un determinado estado oculto.

Aunque generalmente los sistemas de predicción basados en HMMs presenten ventajas sobre el resto, en determinados casos puede no ser ésta la situación. Recientemente se han desarrollado métodos de predicción que combinan HMMs y NNs (Taylor et al, 2003) (Nilsson et al, 2000) para intentar anular los errores que uno u otro método puedan cometer.

<sup>1</sup> Modelo de Markov de primer orden: Cadena discreta de estados en la que la probabilidad de un estado depende únicamente del suceso inmediatamente anterior.

### *Aproximación experimental*

Los programas empleados en este trabajo fueron:

**PHDhtm** (Rost et al, 1996) <http://www.predictprotein.org>  
**SOSUI** (Hirokawa et al, 1998)  
<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>  
**Tmpred** (Hofmann, 1993)  
[http://www.ch.embnet/cgi-bin/TMPERD\\_from.htm](http://www.ch.embnet/cgi-bin/TMPERD_from.htm)  
**SPLIT** (Juretic et al, 1993) <http://split.pmfst.hr/split/4/>  
**MEMSAT** (Jones et al, 1994) <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk>  
**MPEX** (Jaysinghe S et al, 2006) <http://blanco.biomol.uci.edu/mpex/>  
**DAS** (Cserzö et al, 1997) <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>  
**TMHMM** (Krogh et al, 2001)  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>  
**HMMTOP** (Tusnady & Simon, 2001) <http://www.enzim.hu/hmmtop/>  
**TOPPRED** (Claros & von Heijne, 1994)  
<http://biowb.pasteur.fr/seqanal/tmp/toppred/>  
 **$\Delta G$  prediction server** (Hessa et al, 2007) <http://www.cbr.su.se/DGpred/>

Muchos de los programas de predicción de fragmentos TM permiten al mismo tiempo la identificación de los dominios solubles como translocados (luminales) o no-translocados (citosólicos). La determinación de la topología se basa fundamentalmente en dos aspectos: (1) La distribución de cargas en las regiones adyacentes a los dominios TM, la conocida *positive-inside rule* (de Gier & Lührink, 2001; von Heijne, 1986; von Heijne & Gavel, 1988) (apartado i.9.2) y (2) la identificación de la secuencia señal en el extremo N-t de las proteínas.

Recientemente se ha desarrollado un nuevo algoritmo ( *$\Delta G$  prediction server*) en el que dada una secuencia de aminoácidos se estima la diferencia aparente de energía libre ( $\Delta G_{app}$ ) para la inserción de dicha secuencia en la membrana a través del translocón (Hessa et al, 2005; Hessa et al, 2007). Un valor negativo de  $\Delta G_{app}$  indica que la secuencia será reconocida por la compleja maquinaria del translocación como un fragmento TM, por el contrario, un valor positivo no implica necesariamente que la secuencia no sea TM, sino que el segmento no es capaz de insertarse eficientemente por sí mismo, pudiendo requerir para su inserción la interacción con alguna otra hélice TM (de: <http://www.cbr.su.se/DGpred/>). En este caso las predicciones



se basan en una escala de propensión obtenida experimentalmente empleando un sistema de traducción *in vitro* (Hessa et al, 2005) (Hessa et al, 2007), siendo ésta la primera escala de propensión biológica (apartado i.7.2).

No existen muchos trabajos que evalúen de manera independiente la precisión de los diferentes métodos de predicción de fragmentos TM. Teniendo en cuenta el conjunto de trabajos realizados en este sentido hasta la fecha, no parece que haya ningún método de predicción que sea significativamente mejor que el resto. Generalmente los métodos más sencillos, aquellos basados en escalas clásicas de hidrofobicidad, son los menos precisos. Aún así todos los programas parecen presentar dos grandes carencias. (1) En proteínas que presentan más de cinco regiones hidrofóbicas los fragmentos TM son identificados con poca precisión (Cuthbertson et al, 2005). Probablemente por la falta de información acerca de las interacciones hélice-hélice que posiblemente se están produciendo. (2) Ninguno de los métodos está diseñado para la identificación de dominios de membrana helicoidales mas allá de la visión clásica de la hélice TM (ej. hélices cortas o lazos de re-entrada). Otro error común pero subsanado en alguno de los métodos más modernos es la incapacidad de los algoritmos para diferenciar entre una secuencia señal y un verdadero fragmento TM.

Es difícil conocer cómo se comportan estos programas (en cuanto a fiabilidad de los resultados obtenidos) cuando se enfrentan a secuencias frente a las que no han sido entrenados, dado que todas las comparativas realizadas a día de hoy entre los diferentes métodos de predicción emplean para probar los programas el mismo conjunto de proteínas utilizadas en el diseño de los algoritmos (Punta et al, 2007).

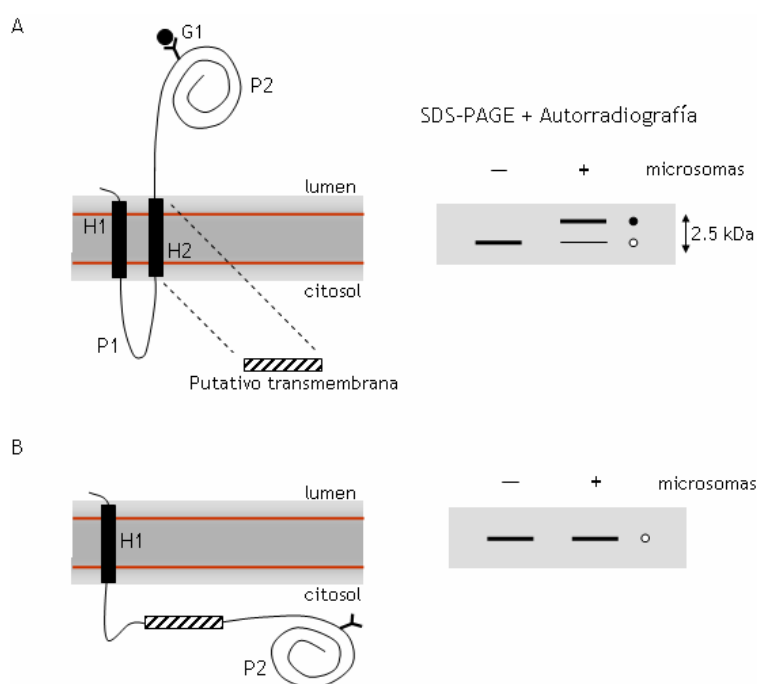
### **ex.1.2 Mapeo por glicosilación**

El método experimental empleado en el presente trabajo para la identificación de las regiones hidrofóbicas con capacidad para insertarse en la membrana fue la técnica de **mapeo por glicosilación**, utilizando la proteína modelo de *E.coli*, **Lep** (*Leader Peptidase*). Este método, desarrollado en el laboratorio del Profesor Gunnar von Heijne en la década de los 90, se basa en que la adición enzimática de oligosacáridos por la OST se puede dar únicamente en aquellas dianas de glicosilación que se encuentren en proteínas translocadas al lumen del retículo endoplasmático o en los

### *Aproximación experimental*

dominios luminales de las proteínas de membrana. Debido a la localización del sitio activo de la OST (proteína de membrana asociada al translocón) (apartado i.8.5) aquellas dianas de glicosilación en proteínas citosólicas o en los dominios citosólicos de las proteínas de membrana no serán modificadas.

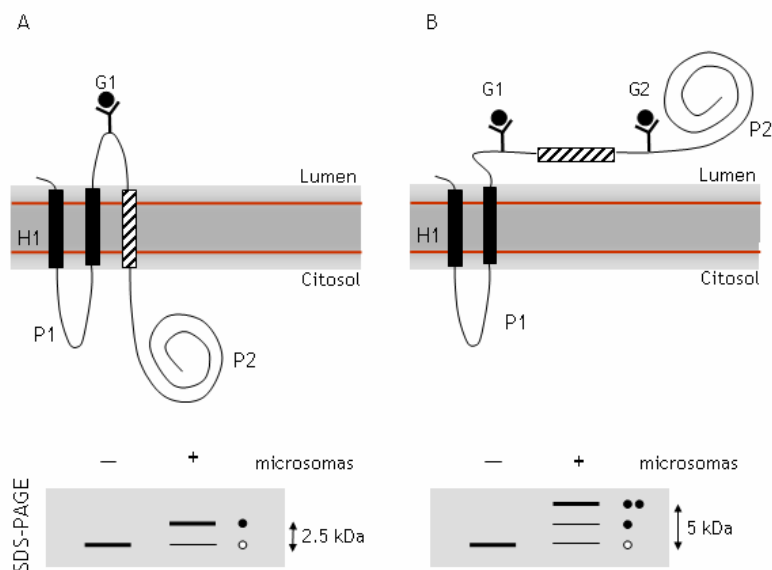
La peptidasa de la secuencia señal de *E.coli* (Lep) es una proteína integral de membrana, localizada en la membrana interna de la bacteria. Presenta dos dominios TM, (H1 y H2) unidos por un lazo citosólico (P1) y un dominio periplásmico (P2) (figura ex.1 A). La topología de la proteína posiciona ambos extremos, amino- y carboxilo-terminal, en el periplasma. Mediante mutagénesis dirigida se introdujo una diana de glicosilación (Asn-Ser-Thr, G1) en P2, que será reconocida por la OST cuando la proteína sea traducida en presencia de membranas microsomales. Para analizar la inserción de regiones hidrofóbicas en membranas, el dominio H2 de Lep es sustituido por el putativo fragmento TM objeto de análisis, la quimera de Lep generada mantiene su capacidad para dirigirse a membranas gracias al H1 el cual actúa como secuencia señal. Únicamente si la región a estudio es reconocida como un fragmento TM por la maquinaria del translocón (apartado I.8) la diana G1 podrá ser glicosilada. Mientras que si el fragmento analizado es incapaz de insertarse en la bicapa la diana de glicosilación permanecerá en el citosol, y por lo tanto no será modificada (figura ex1 B). Para conocer la capacidad de inserción de las regiones a estudio las quimeras son traducidas *in vitro* utilizando lisado de reticulocito (el cual aporta la maquinaria de traducción), microsomas derivados de retículo endoplasmático (como fuente de membranas) y aminoácidos marcados radiactivamente con [<sup>35</sup>S]. Posteriormente las muestras se someten a una electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las versiones de Lep glicosiladas y no glicosiladas presentaran una movilidad electroforética diferente debido a que la glicosilación aumenta el peso molecular de la proteína en aproximadamente 2.5 kDa (figura ex1).



**Figura ex.1. Mapeo por glicosilación.** **A.** Cuando el dominio H2 de Lep es sustituido por una región capaz de insertarse, G1 será glicosilado, lo que producirá un retraso de aproximadamente 2.5 kDa en la movilidad electroforética de la proteína. **B.** Si la secuencia a estudio es por el contrario soluble, la quimera de Lep presentará la misma movilidad electroforética en presencia y ausencia de membranas, dado que G1 no puede ser modificada cuando se encuentra en el citosol. Un círculo negro indica glicosilación mientras que un círculo vacío no glicosilación.

Recientemente este sistema ha sido optimizado, la putativa región TM es ahora introducida en el dominio P2 (en lugar de reemplazar a H2), quedando flanqueada por dos dianas de glicosilación artificiales (G1 y G2). Si la región objeto de estudio se inserta en la membrana sólo G1 permanecerá en el lumen y será por tanto glicosilada (figura ex.2 A). Cuando el translocón no identifique a la secuencia problema como dominio TM ambas dianas G1 y G2 podrán ser glicosiladas (figura ex.2 B). El estado de glicosilación de la proteína lo podremos conocer a través de su movilidad electroforética.

## Aproximación experimental



**Figura ex.2: Identificación de fragmentos transmembrana empleando el sistema de Lep.** A. La secuencia a estudio se inserta en el dominio P2 entre dos dianas de glicosilación (G1 y G2), de manera que si ésta es capaz de insertarse en la membrana sólo G1 permanecerá en el lumen y será glicosilado. B. Si por el contrario la región a estudio no es reconocida como un dominio TM ambas dianas G1 y G2 podrán ser modificadas por la OST. Es posible diferenciar el estado de glicosilación de Lep por la movilidad electroforética que presenta en geles de SDS-PAGE (sin glicosilar círculo vacío, mono-glicosilada un círculo negro, y doble-glicosilada dos círculos negros).

## Ex.2 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ASOCIACIÓN A MEMBRANAS

### ex.2.1 Sedimentación de membranas

Un método sencillo y ampliamente empleado para determinar si una proteína se encuentra asociada a membranas es la sedimentación mediante ultracentrifugación. Las membranas microsomales y las proteínas asociadas a éstas (bien integralmente o bien de manera periférica (Schaad et al, 1997)) son sedimentadas a 100.000 g, mientras que las proteínas solubles citosólicas

permanecen en el sobrenadante. En el sedimento de estas ultracentrifugaciones se encuentran también las proteínas solubles que son translocadas al interior de los microsomas. Para diferenciar entre estas situaciones será necesario realizar un tratamiento previo a la ultracentrifugación.

**Extracción Alcalina.** El tratamiento con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 11.5) transforma los microsomas en bicapas abiertas liberando su contenido. Tras la ultracentrifugación en el sedimento encontraremos ahora únicamente las proteínas asociadas a las membranas, mientras que las proteínas translocadas al lumen se acumularán en la fracción soluble.

**Tratamiento con urea.** La urea es un potente agente desnaturalizante que solubiliza las proteínas unidas a la membrana de manera periférica. Las proteínas integrales de membrana no pierden su asociación a los microsomas con este tratamiento, permaneciendo en la fracción sedimentada tras el proceso de ultracentrifugación.

### ex.2.2 Reparto de fases con Triton X-114

El triton X-114 es un detergente que por encima de su concentración micelar crítica presenta una elevada capacidad para solubilizar membranas cuando se encuentra entre 0 y 20° C. A medida que la temperatura sube aumenta el tamaño micelar del detergente hasta que, por encima de 20° C se produce una clara separación de fases. A esta temperatura con una centrifugación a baja velocidad podremos recuperar una fase acuosa y otra orgánica. Las proteínas integrales de membrana así como los lípidos se localizan fundamentalmente en la fase orgánica mientras que las proteínas periféricas y solubles se recuperan de la fase acuosa (Bordier, 1981).

### ex.2.3 Flotación de membranas

Otra técnica que permite diferenciar entre proteínas integrales de membrana y aquellas asociadas de manera periférica es la flotación de membranas o centrifugación de equilibrio (Kida et al, 2000). En este tipo de centrifugación los componentes se separan en función de su densidad de flotación y no en relación a su peso o forma. La centrifugación en este caso se hará en un gradiente de densidad que se obtiene empleando generalmente cloruro de cesio o sacarosa. Las muestras son centrifugadas hasta que alcanzan una

### *Aproximación experimental*

posición de equilibrio donde su densidad es igual a la densidad de la solución (ya sea de sacarosa o cloruro de cesio) que las rodea. La centrifugación de equilibrio se suele emplear para separar membranas de diferentes orgánulos aunque es suficientemente sensible como para separar macromoléculas marcadas con diferentes isótopos.

En la técnica utilizada en este trabajo las membranas se depositan en el fondo de un tubo de centrifuga en una solución que presenta una concentración 1.6 M de sacarosa, sobre ésta se depositan dos capas de sacarosa 1.25 y 0.25 M respectivamente, generándose así un gradiente de densidad discontinuo. Tras la centrifugación las membranas flotarán hasta alcanzar el gradiente que iguale su densidad arrastrando con ellas únicamente a las proteínas integrales de membrana. Para el correcto funcionamiento de este método es necesario que las membranas no formen microsomas para lo cual se debe trabajar siempre con un pH elevado (Deitermann et al, 2005; Moise et al, 2004).

### **Ex.3 DETERMINACIÓN DE LA TOPOLOGÍA DE UNA PROTEÍNA DE MEMBRANA**

La topología de una proteína de membrana queda definida por la localización de sus extremos amino- (N-t) y carboxilo-terminal (C-t) y por el número de dominios TM que presenta. En el presente trabajo con el propósito de determinar la localización de los extremos N-t y C-t se emplearon diferentes métodos *in vitro* e *in vivo*, basados en glicosilación, protección frente a la digestión con proteasas, marcaje específico de cisteínas y en la fluorescencia de la GFP.

#### **ex.3.1 Determinación de la topología mediante modificación por glicosilación**

La OST es una proteína de membrana asociada al complejo del translocón. Como se ha mencionado anteriormente presenta su sitio activo en el lado luminal de la membrana, por lo que sólo es capaz de transferir azúcares a aquellas dianas de glicosilación de las proteínas de membrana que se encuentren en dominios luminales, siempre y cuando éstas se encuentren a una distancia mínima de la membrana del retículo endoplasmático de entre

12 y 14 aminoácidos (Nilsson & von Heijne, 1993). La ubicación de una diana de glicosilación (Asn-X-Thr, siendo X cualquier aminoácido excepto Pro) permite averiguar por tanto si el dominio hidrofílico donde se encuentra la diana está expuesto al lumen del retículo o al citosol. El sitio aceptor de glicosilación empleado podrá ser natural o introducido artificialmente, lo que permite determinar la localización de cualquier región no TM de la proteína. La sencillez de esta técnica admite que pueda ser aplicada tanto *in vitro* (Vilar et al, 2002) como *in vivo* (Das et al, 2008). Existen diversos controles que pueden realizarse para asegurar que el aumento en el peso molecular de la proteína se debe a su glicosilación. (1) Traducción en ausencia de membranas (en aquellos caso que el experimento lo permita). (2) Tratamiento con **endoglicosidasa H**, enzima altamente específico que elimina oligosacáridos ricos en manosa unidos a residuos de asparragina. (3) Empleo de péptidos aceptores en exceso que compiten por la unión al sitio activo de la OST, disminuyendo así la eficiencia de glicosilación.

### ex.3.2 Determinación de la topología mediante digestión con proteasas

Las proteasas son enzimas implicados en la hidrólisis de largas cadenas polipeptídicas. Algunas de ellas pueden digerir únicamente el aminoácido localizado en el extremo amino- o carboxilo-terminal (exopeptidasas) mientras que otras pueden realizar su función en cualquier posición de la proteína siempre y cuando se cumplan los requerimientos a nivel de secuencia de aminoácidos necesarios (endopeptidasas). Las enzimas proteolíticas (únicamente las endopeptidasas) son un técnica ampliamente utilizada para la determinación de la topología de proteínas de membrana (Hsu et al, 2008; Imperi et al, 2008). Generalmente se emplea **Proteínasa K** (PK) o Tripsina aunque existen numerosos enzimas que pueden ser utilizadas, como pepsina (Polverino de Laureto et al, 1999), papaina (Kuma et al, 2002) o quimiotripsina (Franke et al, 2007). Muchas de estas proteínas mantienen su actividad en presencia de distintas sustancias desnaturizantes como: SDS, urea o agentes quelantes (EDTA); además trabajan en un amplio rango de pH, esta versatilidad las convierte en una potente herramienta de trabajo. El fundamento es similar para todas ellas. Estas proteasas son capaces de hidrolizar otras proteínas pero ninguna de ellas es capaz de atravesar la bicapa lipídica, de manera que, únicamente aquellos dominios de las proteínas de membrana accesibles a las proteasas serán digeridos. Analizando mediante electroforesis el número y tamaño de

### *Aproximación experimental*

los péptidos que se generan tras la digestión, es decir, aquellos que son inaccesibles para las proteasas, (siempre y cuando estos fragmentos producidos sean de un tamaño suficientemente grande) podremos conocer la topología de la proteína.

#### **ex.3.3 Determinación de la topología mediante marcaje específico de cisteínas**

Otra estrategia comúnmente empleada para la determinación de la orientación de una proteína de membrana consiste en el marcaje específico de Cys. Para ello se utilizan reactivos químicos derivados de maleimidas o de iodoacetamidas, capaces de unirse específicamente al grupo sulfhidrilo de las Cys accesibles (las maleimidas reaccionan 1000 veces más rápido con los grupos SH que con los grupos amino a pH neutro). El enlace que se forma es estable incluso en presencia de detergentes (SDS) aunque el rango de pH en el que se puede trabajar es muy pequeño, y siempre en torno al pH neutro. Los compuestos utilizados para el estudio de la topología son incapaces de atravesar la membrana, de forma que sólo aquellas Cys localizadas en el mismo lado de la bicapa que estos reactivos serán modificadas. En este trabajo se emplearon dos agentes modificadores de Cys, 4-acetamido-4'-maleimidestilbeno-2,2'-ácido disulfónico (**AMS**), derivado hidrosoluble de la maleimida con un peso molecular de únicamente 500 Da (Joly & Swartz, 1997) y Maleimida-Metoxi polietilenglicol (**MAL-PEG**) derivado del polietilenglicol unido a la maleimida del cual se han diseñado variantes con diferentes pesos moleculares, el empleado en este trabajo es de 5 kDa (Lu & Deutsch, 2001).

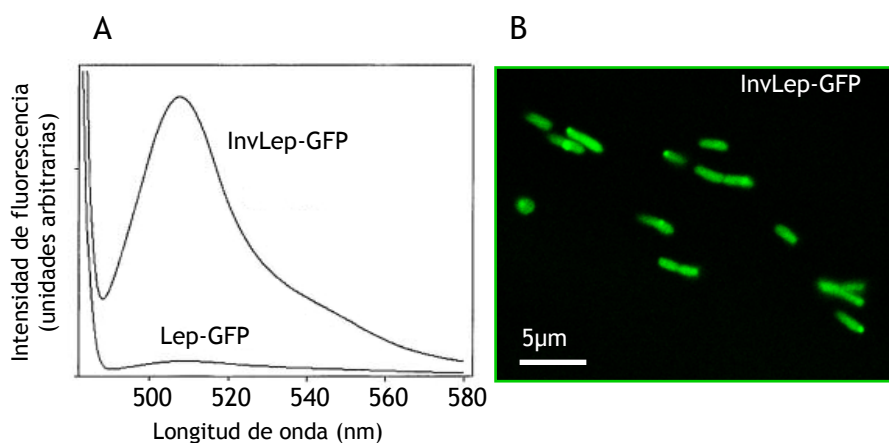
#### **ex.3.4 Determinación de la topología de proteínas de membrana en células de *E. coli* empleando la proteína de fluorescencia verde**

La determinación de la topología de las proteínas de membrana de *E. coli* suele realizarse *in vitro*, debido a que la mayoría de métodos desarrollados para el estudio *in vivo* requieren un esfuerzo significativo. Con objeto de superar estas limitaciones Drew y colaboradores desarrollaron una técnica sencilla para determinar la topología de proteínas de membrana en *E. coli* basada en fusiones a la Fosfatasa Alcalina (PhoA) y a la **proteína de fluorescencia verde** (GFP) y en el que para el diseño de las fusiones se toma



como punto de partida el resultado obtenido con los programas de predicción de topología (sección ex1.1) (Drew et al, 2002).

La fosfatasa alcalina funciona como un marcador periplásmico, ya que sólo es capaz de plegarse en su conformación activa en el periplasma de la bacteria, cualidad que se mantiene incluso cuando PhoA se encuentra fusionada a una proteína de membrana (Akiyama & Ito, 1993; Derman & Beckwith, 1991). Por el contrario la GFP se pliega eficientemente, y es por tanto capaz de emitir fluorescencia, únicamente cuando presenta una localización citoplasmática y no cuando es dirigida al periplasma (debido a las condiciones red-ox del medio) (Feilmeier et al, 2000). Esta capacidad para diferenciar entre citoplasma y periplasma que presenta la GFP se mantiene aún cuando se encuentra fusionada al extremo C-t de una proteína de membrana (figura ex.3). La intensidad de fluorescencia a 508 nm será por lo tanto un indicador de la localización del extremo C-t de la proteína de membrana. Empleando este método se han llegado a realizar en un mismo trabajo modelos topológicos para 601 proteínas de *E.coli* (Daley et al, 2005).



**Figura ex.3. Determinación de la topología de proteínas de membrana en *E. coli* empleando la GFP como marcador.** A: Espectro de emisión de fluorescencia tras excitación a 485 nm. Se puede observar los niveles de fluorescencia para Lep-GFP (proteína que presenta una orientación N-t/C-t periplasmática) y para InvLep-GFP (mutante de Lep con la topología invertida, N-t y C-t citosólicos (Andersson & von Heijne, 1993; von Heijne, 1989)). Adaptado de Drew et al. (Drew et al, 2002). B: Imagen obtenida de *E. coli* expresando InvLep-GFP, en un microscopio confocal Leica TCS-SP (SCSIE, Universitat de València) con una longitud de onda de excitación de 488 nm y recuperando la emisión entre 500 y 600 nm.

### *Aproximación experimental*

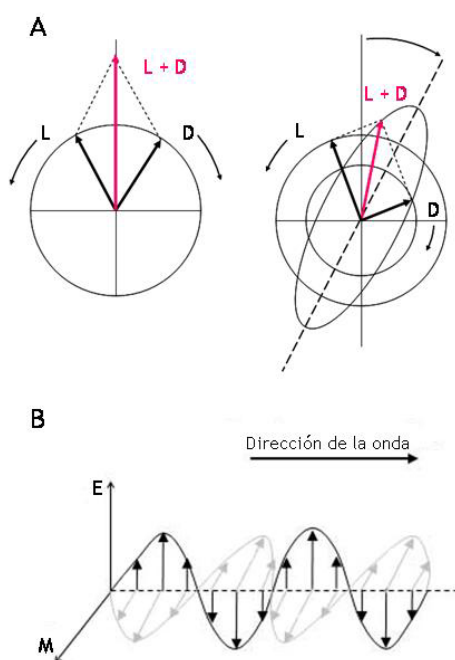
Esta técnica podrá ser empleada para el estudio de la topología de proteínas de membrana que no sean de *E. coli* siempre que se realicen los controles necesarios y se tengan en cuenta las limitaciones de la técnica.

#### **Ex.4 DICROÍSMO CIRCULAR**

El dicroísmo circular (CD) es un método espectroscópico que permite obtener datos estructurales de baja resolución de proteínas y péptidos en solución así como en entornos que mimetizan las membranas biológicas (detergentes, vesículas lipídicas, etcétera), los resultados pueden ser obtenidos por tanto en ambientes parecidos a aquellos en los que las proteínas de membrana residen y ejercen su función.

La luz polarizada en un plano puede ser entendida como la suma de dos componentes de luz polarizada circularmente de igual magnitud, uno girando en el sentido de las agujas del reloj (dextrógiro, D) y otro, en el sentido opuesto (levógiro, L) (figura ex.4 A). El vector resultante de la suma de D y L permanecerá siempre en un plano, dado que ambos componentes giran en fase. La representación de la magnitud de este vector (suma de L y D) en un plano produce una onda oscilante (figura ex.4 B).

Si ambos componentes (D y L) son absorbidos con igual intensidad por un compuesto se generará una radiación polarizada en el plano original pero con una intensidad menor. Si por el contrario se produce una absorción diferencial de estos dos componentes se producirá el efecto conocido como dicroísmo circular. En este caso la radiación resultante variará el plano de polarización con el tiempo dado que el vector resultante de la suma de D y L (ahora de magnitud diferente) ya no permanece constante. Cuando esto ocurre se dice que la luz se encuentra polarizada elípticamente (figura ex.4 A y ex.5).



**Figura ex.4. Efecto de dicroísmo circular.** A. Cuando los dos componentes de la luz polarizada en un plano L y D presentan igual magnitud (izquierda) al combinarse se genera una radiación polarizada en un plano, línea violeta. Si L y D tienen magnitudes diferentes, debido a la absorción diferencial de L y D por un compuesto quiral (derecha), la radiación resultante está polarizada elípticamente. B. Representación esquemática en un plano del componente eléctrico y magnético de la luz polarizada.

A una determinada longitud de onda:

$$\Delta A = A_L - A_D$$

Siendo  $\Delta A$  la diferencia de absorción entre la luz circularmente polarizada a la izquierda ( $A_L$ ) y a la derecha ( $A_D$ ). Este es el valor que generalmente muestran los espectropolarímetros, aunque por motivos históricos se suele trabajar con elipticidad molar  $[\theta]$ . La relación entre  $[\theta]$  y  $\Delta A$  es:

$$[\theta] = 3298.2 \Delta \epsilon$$

### *Aproximación experimental*

$\Delta\varepsilon$  procede de expresar  $\Delta A$  según la ley de Lambert-Beer<sup>1</sup>, es decir:

$$\Delta A = (\varepsilon_L - \varepsilon_D) cl$$

Donde  $\varepsilon_L$  y  $\varepsilon_D$  representan los coeficientes de absorción para la luz circularmente polarizada hacia la izquierda y hacia la derecha respectivamente,  $c$  es la concentración molar y  $l$  la longitud de paso en centímetros.

Entonces

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_D$$

$\Delta\varepsilon$  representa el coeficiente molar de dicroísmo circular de la muestra para una determinada longitud de onda.

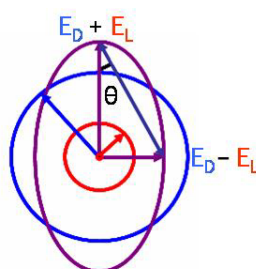
El coeficiente que relaciona  $\Delta\varepsilon$  con  $\Delta A$  (3298.2) se obtiene al definir la elipticidad de la polarización como:

$$\tan \theta = (E_D - E_L) / (E_D + E_L)$$

$E_D$  y  $E_L$  representa la magnitud de los vectores del campo eléctrico de la luz polarizada circularmente a derecha e izquierda respectivamente (figura ex.5).

Existen tres métodos a través de los cuales los espectropolarímetros miden el efecto del CD. (1) Modulación, es el método más común, la radiación incidente se alterna constantemente entre los componente L y D mediante un modulador. (2) Sustracción directa, ambos componentes (L y D) son medidos de forma separada tras atravesar la muestra. (3) Elipsométrico, se mide directamente la elipticidad de la radiación transmitida.

<sup>1</sup> La ley de Lambert-Beer relaciona de manera empírica la absorción de la luz con las propiedades del material que atraviesa. Dicha ley establece que hay una dependencia logarítmica de la luz transmitida a través de una sustancia con el producto del coeficiente de absorción de dicha sustancia y la distancia que el haz de luz ha de recorrer.



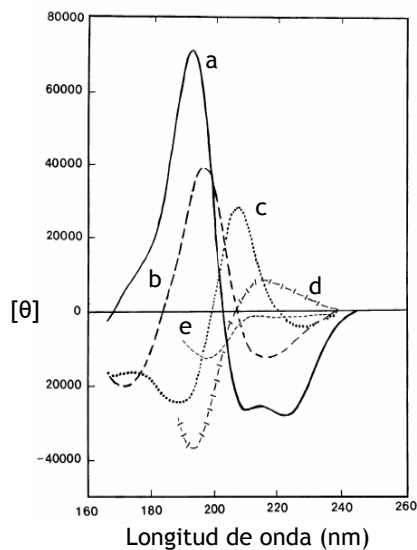
**Figura ex.5. Descripción del ángulo  $\theta$ .** La elipticidad de la polarización se puede parametrizar mediante el ángulo formado por los vectores de la magnitud de los componentes L y D del campo eléctrico de una radiación.

### Aplicaciones del dicroísmo circular

Existe un gran número de aplicaciones para el dicroísmo circular dentro del campo de la Biología Molecular y la Bioquímica, identificación de sitios de unión entre proteínas y ligandos (Zsila et al, 2004), orientación de proteínas en la membrana (Bulheller et al, 2007), determinación del grado de plegamiento/desplegamiento (Dobson, 2004; Jemth et al, 2004), pero sin duda la más común es la identificación de la composición en estructura secundaria de una proteína (Whitmore & Wallace, 2008) o péptido (Kelly & Price, 2000; Navarro et al, 2006).

Las proteínas presentan al menos tres cromóforos de interés, la cadena lateral de los aminoácidos aromáticos (absorben entre 260 y 320 nm), los puentes disulfuro (débil absorción en torno a 260 nm) y el enlace peptídico (absorción por debajo de 240 nm). Es este último cromóforo el único presente en todas las proteínas y el más dependiente de la estructura secundaria. En esta región existen dos transiciones electrónicas, una débil y amplia ( $n \rightarrow \pi^*$ ) centrada en los 220 nm y otra más intensa ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) cerca de los 190 nm. Dichas transiciones se verán afectadas por el entorno y por lo tanto por la estructura secundaria de la proteína (Kelly et al, 2005). Los diferentes tipos de estructura secundaria presentan unos espectros de CD característicos (figura ex.6).

*Aproximación experimental*



**Figura ex.6. Espectros de CD estándares para diferentes tipos de estructuras secundarias.** (a) alfa hélice, (b) hoja beta antiparalela, (c) giro beta, (d) hélice extendida (e) estructura irregular. Adaptado de (Kelly et al, 2005).

Existen diferentes algoritmos que estiman la composición de estructura secundaria a partir del espectro de CD en el ultravioleta lejano. La mayoría de estos programas emplea bases de datos de espectros de CD de proteínas cuya estructura ha sido resuelta por cristalografía de rayos X (Sreerama & Woody, 2004a; Sreerama & Woody, 2004b). La serie de proteínas empleada como referencia (existen diferentes bases de datos optimizadas para diferentes tipos de proteínas) será por tanto un factor crucial para la fiabilidad de los resultados obtenidos. Estas bases de datos no incluyen estructuras de péptidos por lo que se debe ser extremadamente cuidadoso en el empleo de estos algoritmos para la determinación de la composición de estructura secundaria de un péptido (Bierzynski, 2001).

## Ex.5 COMPORTAMIENTO INTERFACIAL DE PÉPTIDOS HIDROFÓBICOS

### ex.5.1 Tensión superficial

Es la fuerza que actúa sobre la superficie de un líquido y que tiende a minimizar su área. La tensión superficial está causada por la atracción entre las moléculas del líquido, debida a diferentes fuerzas intermoleculares. Disueltas dentro de un líquido las moléculas son atraídas de igual manera en todas las direcciones lo que resulta en una fuerza neta igual a cero, este no es el caso en la interfase, aquí las moléculas están sometidas únicamente a una fuerza de atracción hacia dentro, compensada por la resistencia del líquido a comprimirse. Para minimizar la fuerza que se genera en la interfase, el líquido tiende a disminuir el área de la superficie. Los cambios en la tensión superficial pueden medirse mediante la **presión superficial**, la cual se define como:

$$\pi = \gamma^0 - \gamma$$

Donde  $\gamma^0$  es la tensión superficial del líquido puro, en ausencia de cualquier surfactante y  $\gamma$  es la tensión superficial en presencia de surfactante. La presión superficial y la tensión superficial se miden por tanto en las mismas unidades (mN/m) y varían en direcciones opuestas. Un valor de  $\pi = 0$  indica que no se ha producido reducción alguna en la tensión superficial mientras que  $\pi = \gamma^0$  indica que la tensión superficial se ha reducido a 0.

La **balanza de Langmuir** es la técnica más utilizada para medir la presión superficial. Está compuesta por un baño de teflón donde se deposita la sub-fase acuosa, en la inter-fase de la cual se sumerge el sensor (pequeño papel de filtro o varilla de platino). Conociendo las dimensiones del sensor y calibrando la balanza, la fuerza ejercida sobre el sensor puede ser transformada a unidades de presión superficial (es decir, mN/m) (<http://www.nima.co.uk/index.html>). Estas balanzas generalmente presentan un dispositivo que permite variar el área de la interfase sin que esto afecte a la medición de la presión superficial.

### **ex.5.2 Monocapas proteicas**

Algunas proteínas y péptidos (aquellos anfipáticos e hidrofóbicos) se disponen en la interfase aire-líquido de manera espontánea formando monocapas. Las isotermas (variación de la presión superficial con respecto al área de superficie a una temperatura constante,  $(\pi-A)$ ) de monocapas proteicas han sido ampliamente utilizadas para obtener información sobre el área ocupada por molécula (Perez-Gil et al, 1992; Serrano et al, 2007), la cual está relacionado con la estructura secundaria que presentan los péptidos (Maget-Dana et al, 1999; Taylor, 1990). Las hojas beta presentan un área por residuo de entre 18 y 25 Å<sup>2</sup> mientras que aquellos péptidos que formen hélices alfa pueden alcanzar áreas por residuo de 50 Å<sup>2</sup>. Esta técnica permite también obtener datos sobre la disposición del péptido en la interfase (si el péptido se encuentra extendido o empaquetado) así como de la rigidez estructural que presenta la molécula a estudio (capacidad del péptido para variar su estructura en función de la presión superficial).

### **ex.5.3 Inserción de péptidos en monocapas lipídicas preformadas**

Las monocapas formadas por lípidos son un excelente modelo para el estudio de las interacciones entre una determinada molécula y las membranas celulares (Brockman, 1999). En este sistema un gran número de variables (naturaleza y grado de empaquetamiento de los lípidos, composición de la subfase, temperatura etc.) pueden ser controladas. El interés de las monocapas de fosfolípidos como modelo de membrana radica también en su homogeneidad, estabilidad y geometría, en la que los lípidos presentan una orientación específica. Además este sistema permite un riguroso análisis termodinámico.

La interacción entre la monocapa de lípidos y el péptido o la proteína puede ser medida de dos maneras. (1) Manteniendo constante la presión mientras se monitoriza el aumento del área de la monocapa provocado por la inserción del péptido. (2) El área se mantiene constante y son los cambios en la presión superficial lo que se registra. En este segundo método, el cual es el más común y el empleado en este trabajo, las monocapas de lípidos se forman a una determinada presión inicial mediante la adición de lípido sobre la interfase aire/agua y posteriormente una cantidad constante y previamente determina de péptido es añadido en la



subfase. El péptido provocará un aumento de presión superficial si se asocia con la monocapa. Los parámetros que han de tenerse en consideración son:  $\pi_0$  presión inicial (refleja el grado de empaquetamiento de los lípidos), concentración de péptido en la subfase y  $\Delta\pi$ , variación máxima de la presión superficial tras la adición del péptido. La  $\pi_0$  a partir de la cual el péptido no es capaz de insertarse se denomina presión de exclusión ( $\pi_{ex}$ ) (Maget-Dana, 1999). Una representación de la de  $\Delta\pi$  frente a  $\pi_0$  permite calcular la presión crítica ( $\pi_c$ ), presión máxima a la cual el péptido es capaz de asociarse a la monocapa. Valores de  $\pi_c$  mayores de 30 mN/m son indicativos de una capacidad intrínseca del péptido para asociarse con bicapas de fosfolípidos (Brockman, 1999).

#### ex.5.4 Isotermas péptido/lípido

Para obtener monocapas formadas por lípido y péptido, generalmente se mezclan previamente los diferentes componentes en el disolvente adecuado para después depositar la mezcla en la interfase aire/agua. Con este sistema se evitan aquellos artefactos que se hayan podido producir tras la exposición temporal de los péptidos a un componente polar (Serrano et al, 2006). Para obtener datos sobre el comportamiento del componente proteico en el entorno lipídico será necesaria la comparación entre una isoterma pura (aquella que sólo presenta lípido) y las isotermas obtenidas con diferentes porcentajes de péptido. A mayor cantidad de péptido la isoterma estará más expandida debido al área que éste ocupa en la interfase, de igual manera cuanto mas área por molécula ocupe el péptido mayor será el desplazamiento sobre la isoterma pura. Si los componentes son inmiscibles (o perfectamente miscibles) el área que ocupe la monocapa mixta será la suma del área de los dos componentes por separado, cualquier desviación de esta situación ideal nos estará indicando que existe cierto grado de miscibilidad. Una desviación negativa (el área ocupada por los dos componentes es menor que la suma de las áreas de los dos componentes) indica generalmente que existe una interacción entre los componentes de la monocapa. Mientras que desviaciones positivas son indicativas de la formación de agrupaciones bidimensionales o pérdida de homogeneidad en la monocapa. Esta técnica nos permite también comparar la estabilidad de diferentes secuencias proteicas en la monocapa, es decir, qué péptido o proteína presenta mayor afinidad por la monocapa en la que se trabaja; ya

### *Aproximación experimental*

que podemos observar al ir aumentando la presión superficial cuándo un péptido es expulsado de la monocapa (Maget-Dana, 1999).

### **Ex.6 LIBERACIÓN DE CONTENIDOS**

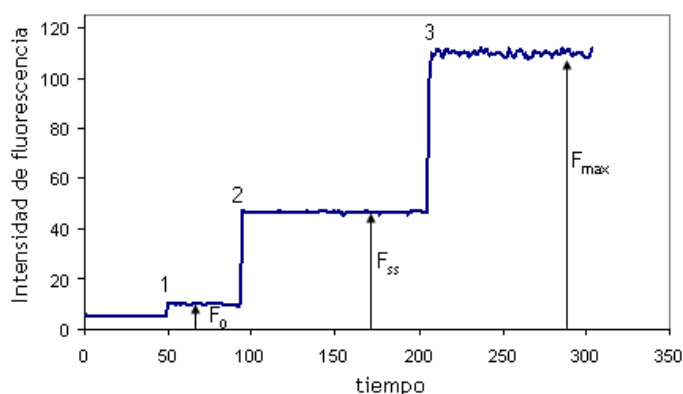
La perturbación que algunos péptidos producen en las membranas puede ser estudiada mediante el análisis de la liberación de los contenidos encapsulados en vesículas lipídicas que se produzca en presencia de la molécula proteica objeto de estudio.

Para la detección de la liberación de contenidos en este trabajo se empleó el método originalmente diseñado por Gitler y colaboradores (Smolarsky et al, 1977), basado en la pareja fluoróforo/extintor ANTS/DPX. Al encapsular en liposomas la sonda fluorescente 8-aminonaftaleno-1,3,6 ácido trisulfónico (ANTS) junto con p-xileno-bis-bromidio de piridinio (DPX), a una determinada concentración, se produce una extinción de la fluorescencia por colisión. Si se ocasiona una perturbación en la membrana que permita la salida del contenido de las vesículas tanto el fluoróforo (ANTS) como el extintor (DPX) se diluirán, lo que irá acompañado de un aumento de la fluorescencia.

El porcentaje de liberación puede ser obtenido a partir de

$$R = (F_{ss} - F_0)/(F_{max} - F_0)$$

Donde  $F_0$  es la fluorescencia basal de los liposomas (LUVs),  $F_{max}$  es la fluorescencia máxima obtenida tras la adición de detergente (en este caso Triton X-100) el cual libera por completo el contenido de los LUVs y  $F_{ss}$  representa la fluorescencia en el equilibrio en presencia de la molécula problema (figura ex.7).



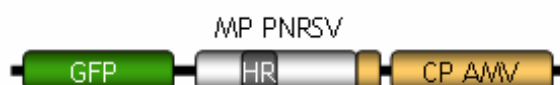
**Figura ex.7. Fluorescencia de LUVs con ANTS/DPX.** Cinética de liberación de contenidos monitorizada mediante fluorescencia. (1) Fluorescencia tras la adición de LUVs, (2) liberación de sonda tras la adición de la molécula a estudio y (3) fluorescencia máxima obtenida tras la adición de Triton X-100.

### Ex.7 ENSAYO *IN VIVO* DE LA CAPACIDAD DE TRANSPORTE DE LA MP DEL PNRSV

El efecto de las mutaciones realizadas sobre la región hidrofóbica de la MP del PNRSV pudo ser analizado *in vivo* empleando el método diseñado por Bol y colaboradores (Sanchez-Navarro et al, 2001; Sanchez-Navarro & Bol, 2001). El RNA 3 del AMV codifica para la proteína de la cápside y la MP. Dicho RNA fue modificado de manera que en él se insertó, bajo un promotor subgenómico del AMV procedente del RNA 4 del mismo virus, la GFP en el extremo 5' (van der Vossen et al, 1995). Esta construcción puede replicarse en plantas transgénicas de tabaco P12, gracias a que éstas expresan de manera constitutiva las replicasas 1 y 2 del AMV. La MP una vez traducida y con ayuda de la CP puede transportar el RNA 3 modificado a las células adyacentes extendiendo en el proceso la fluorescencia que otorga la expresión de la GFP.

En esta construcción la MP del AMV puede ser sustituida por la MP del PNRSV, respetando los 44 aminoácidos del extremo C-t de la MP del AMV, quedando estos aminoácidos fusionados al extremo C-t de la MP del PNRSV (Sanchez-Navarro et al, 1997) (Sanchez-Navarro et al, 2006) (figura ex.8).

### *Aproximación experimental*



**Figura ex.8. RNA 3 del AMV modificado para el estudio de la proteína de movimiento del PNRSV.** La construcción contiene la GFP (verde), la MP del PNRSV (gris) (en la que se destaca en gris oscuro la región hidrofóbica) fusionada a los 44 aminoácidos del extremo C-t de la MP del AMV (naranja) y la CP del AMV (naranja). El RNA completo puede ser expresado en plantas transgénicas de tabaco P12 para el estudio de la funcionalidad de los mutantes de la MP del PNRSV. La detección de la fluorescencia de la GFP se realizó emplear un microscopio confocal a una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de entre 500 y 535 nm

En esta nueva quimera es la MP del PNRSV la encargada de facilitar el movimiento célula-célula. Cualquier cambio realizado sobre la MP y que afecte a su capacidad para transportar el RNA viral provocará que la fluorescencia no se extienda más allá de la célula donde se introdujo el RNA. Por el contrario, si la MP es aún capaz de conducir el RNA a las células adyacentes la fluorescencia irá extendiéndose por la hoja (Herranz et al, 2005). Será necesario comprobar para todos los cambios que se realicen sobre el RNA viral, que la construcción mantiene su capacidad para replicarse, para lo cual se debe observar la presencia de fluorescencia en protoplastos (células vegetales sin pared celular). La detección de la fluorescencia se realiza observando directamente las hojas o los protoplastos con un microscopio confocal, a una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión entre 500 y 535 nm.

# OBJETIVOS

El movimiento intra- e inter-celular de los virus de plantas es un proceso íntimamente ligado al sistema de membranas de la célula vegetal. La naturaleza de la interacción entre las proteínas virales encargadas de transportar el genoma de una célula a otra y las membranas de la célula infectada es, sin embargo, desconocida en la mayoría de los casos. En la presente tesis y con la intención de profundizar en el conocimiento de estas interacciones MP/membrana se abordaron los siguientes objetivos concretos:

1. Demostración *in vitro* e *in vivo* de la asociación y topología en membranas de la MP p7B del MNSV. Identificación del dominio responsable de la inserción de p7B en la membrana y del mecanismo empleado en el proceso de integración.
2. Análisis de la capacidad de la MP p9 del TCV para insertarse en membranas del ER y de los dominios responsables de esta interacción. Determinación de la topología de p9 y de la ruta empleada en su direccionamiento a membranas.
3. Determinación del grado de asociación de la MP p32 del PNRSV a membranas. Identificación y caracterización estructural del dominio responsable de la asociación.
4. Estudio del requerimiento de la región hidrofóbica de p32 para el transporte del RNA viral a través del plasmodesmo. Papel del residuo de prolina ubicado en la región central de la región hidrofóbica de p32.
5. Determinación del grado de asociación de la MP del TMV, p30, a membranas derivadas del ER.

# RESULTADOS

Los estudios realizados con las MPs de los virus de plantas demuestran que éstas requieren de su asociación a diferentes membranas de la célula vegetal para realizar su función (Fisher, 2005). Hasta ahora se ha considerado que al menos una de las MP de cada especie viral es una proteína integral de membrana, habiéndose demostrado que se insertan co-traduccionalmente empleando la maquinaria del translocón (Sauri et al, 2007; Sauri et al, 2005). La inserción de proteínas de membrana en el ER viene determinada generalmente por la presencia de una secuencia señal responsable del direccionamiento de la proteína hasta la maquinaria de inserción en membranas del ER. En el caso de que las MP sean realmente proteínas integrales de membrana y empleen la ruta del translocón como vía para su inserción en membranas alguno de los dominios hidrofóbicos de la proteína deberá desempeñar la función de direccionamiento, además de ser un dominio de anclaje a la membrana dado que estas proteínas carecen de secuencia señal. No hay que descartar la posibilidad de que la asociación a la membrana de los diferentes orgánulos se realice de manera post-traducciona l o incluso que esté mediada por regiones que se asocien a la membrana de forma periférica o bien a través de grupos hidrocarbonados producto de modificaciones post-traduccionales.



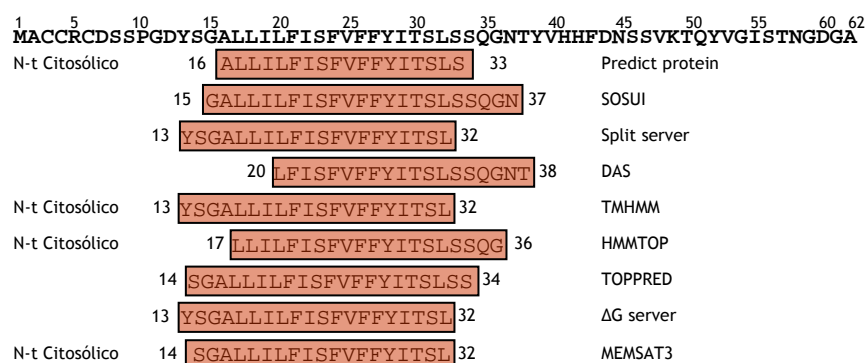
## **R.1 ASOCIACIÓN Y TOPOLOGÍA DE LA PROTEÍNA DE MOVIMIENTO p7B DEL MNSV EN MEMBRANAS DEL ER**

El virus del moteado del clavel (*Carnation mottle virus*, CarMV) es el virus representativo del género *Carmovirus*. Presenta dos pequeñas MPs; p7 es una proteína soluble con un dominio de unión a RNA (Marcos et al, 1999; Vilar et al, 2001; Vilar et al, 2005), mientras que p9 es una proteína integral de membrana con dos dominios TM capaces de interactuar con la SRP y con el canal del translocón (Sauri et al, 2007; Sauri et al, 2005; Vilar et al, 2002). El MNSV, perteneciente también al género *Carmovirus*, codifica en su genoma dos MPs; la primera, p7A, con capacidad para unir RNA (Navarro et al, 2006) y separada por un codón de parada de la segunda MP p7B (apartado i.5.1). Con el fin de conocer si esta última pudiera ser análoga funcional de p9 del CarMV se inició el estudio de la asociación a membranas de p7B del MNSV.

### **r.1.1 Análisis de la secuencia de p7B del virus de las manchas necróticas del melón**

Como punto de partida para el estudio de la asociación a membranas de p7B se empleó el análisis de su secuencia realizado con diferentes programas de predicción de fragmentos TM. El resultado de los cuales se muestra en la [figura r.1.1](#).

Todos los programas utilizados, independientemente del fundamento en el que se basan para realizar las predicciones (ver apartado ex.1.1), sugieren que p7B es una proteína integral de membrana con un único fragmento TM localizado aproximadamente entre los residuos 13 y 38 de la secuencia de aminoácidos de p7B. En los estudios computacionales de predicción de dominios TM cabe destacar que el hecho que diferentes métodos coincidan en la predicción aumenta la fiabilidad de los resultados obtenidos hasta situarla al nivel de los resultados experimentales (Drew et al, 2002; Melen et al, 2003; Nilsson et al, 2000; Rapp et al, 2004). En el caso de p7B todos aquellos programas capaces de estimar la topología predicen para esta MP una misma orientación, N-t citoplasmático/C-t luminal.

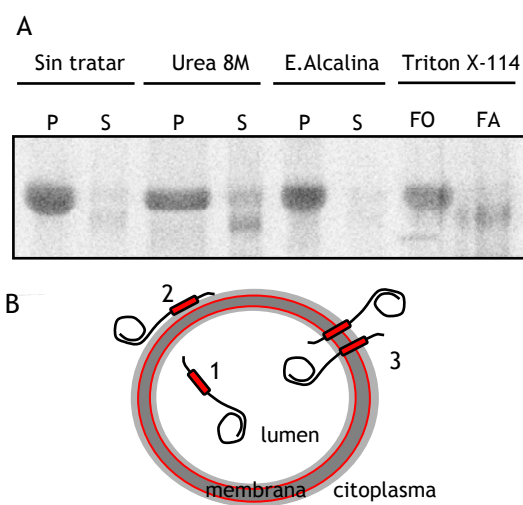


**Figura r.1.1. Predicción de fragmentos transmembrana para p7B.** Resultado de las predicciones de fragmentos TM obtenido empleando varios de los programas disponibles en internet (ver apartado ex.1.1). Todo ellos muestran un único dominio TM, aproximadamente entre los residuos 13 y 38 de p7B. A la izquierda se muestra también el resultado de la topología (indicando la localización del extremo amino terminal) en aquellos casos en los que el programa empleado es capaz de predecirla. La secuencia empleada corresponde al código de acceso ABC67518 en la base de datos del NCBI.

### r.1.2 p7B es una proteína integral de membrana

Para comprobar experimentalmente el resultado de las predicciones de fragmentos TM, la secuencia del gen de p7B se transcribió y se tradujo *in vitro* en presencia de membranas microsomales derivadas del ER y de metionina marcada con  $^{35}\text{S}$ . Tras la ultracentrifugación a 100.000 g de la mezcla de traducción, p7B fue recuperada en el sedimento (figura r.1.2 A, muestras sin tratar), indicando que la MP podría ser una proteína asociada a las membranas de los microsomas (ya sea de manera integral o periférica) o bien una proteína translocada al lumen de los microsomas (figura r.1.2 B), pero descartando la posibilidad de que p7B sea una proteína soluble. Para diferenciar entre las posibilidades mencionadas la mezcla de traducción fue tratada con urea 8M y carbonato sódico (pH 11.5) (apartado Ex.2). La urea solubiliza aquellas proteínas asociadas a la membrana de manera periférica (Schaad et al, 1997), mientras que el lavado con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  transforma los microsomas en bicapas lipídicas abiertas, liberando el contenido luminal, el cual pasará a la fracción soluble (García-Saez et al, 2004; Peremyslov et al, 2004).

Asociación y topología de p7B del MNSV



**Figura r.1.2. Localización en microsomas de la proteína p7B transcrita y traducida *in vitro*.** A: Resultado de la separación de p7B (marcada radiactivamente con  $^{35}\text{S}$ ) entre la fracción de membrana (P, sedimento) y la soluble (S, sobrenadante) tras la precipitación de membranas mediante centrifugación (sin tratar). Antes de la ultracentrifugación las muestras fueron incubadas con Urea 8M o con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 11.5 (E. Alcalina). En las carreras de la derecha se muestra el resultado del particionamiento con Triton X-114 (FO fase orgánica, FA fase acuosa). B: Representación de las diferentes posibilidades de asociación entre p7B y microsomas: 1 luminal, 2 periférica y 3 integral de membrana con las dos orientaciones posibles.

Tras la ultracentrifugación de las muestras procesadas con ambos tratamientos, se observó que p7B permanece en todos los casos en la fracción de membrana (figura r.1.2 A) lo que indicaría que es una proteína integral de membrana. Para confirmarlo la mezcla de traducción de p7B fue tratada con Triton X-114, detergente capaz de generar dos fases, una acuosa con las proteínas hidrofílicas y otra orgánica donde se encontrarán los lípidos y las proteínas hidrofóbicas (Bordier, 1981) (apartado ex.2.2). Dado que p7B se encuentra casi exclusivamente en la fase orgánica podemos afirmar que es una proteína integral de membrana y que presenta en su secuencia la información necesaria para su direccionamiento a las membranas del ER.

### **r.1.3 Inserción del fragmento TM de p7B en membranas biológicas**

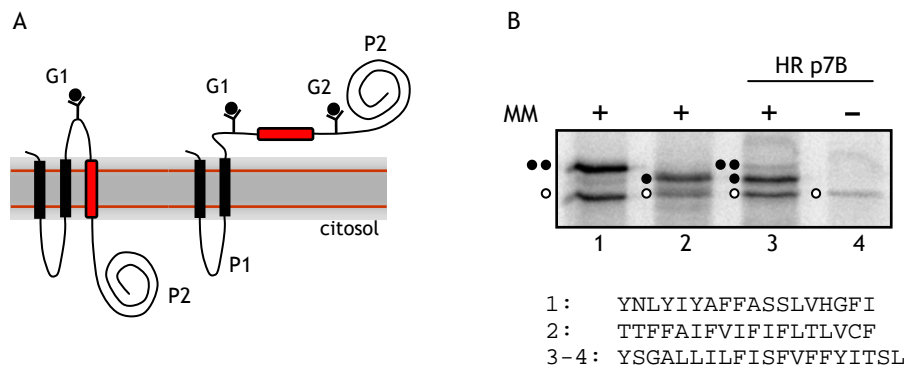
La inserción en membranas de la región hidrofóbica de p7B fue analizada empleando el sistema de Lep (apartado ex.1.2) (Hessa et al, 2007; Hessa et al, 2005). En este sistema la región a ensayar es introducida en el dominio P2 de Lep, donde se encuentra flanqueada por dos dianas de glicosilación (G1 y G2). Tras la traducción *in vitro* de la quimera en presencia de microsomas y metionina marcada con <sup>35</sup>S, un retraso electroforético de 5 kDa respecto a la proteína traducida en ausencia de membranas indicará que ambas dianas de glicosilación (G1 y G2) han sido modificadas y que por tanto se encuentran en el lumen, debido a que la secuencia a estudio no ha podido insertarse como un dominio TM. Si la diferencia en la movilidad electroforética es de 2.5 kDa, únicamente una de las dianas (G1) habrá sido glicosilada (es decir, permanece en el lumen), ya que la región hidrofóbica a estudio habrá sido reconocida esta vez como un segmento TM por la maquinaria del translocón.

La traducción de las construcciones de Lep que contienen la región hidrofóbica (HR) de p7B predicha como dominio TM por los programas *Split Sever*, TMHMM y  $\Delta G$  *predicción server* (residuos 13-32) produjo versiones de P2 principalmente mono-glicosiladas (figura r.1.3), lo que indica la inserción en membranas biológicas de esta región. Como controles de inserción y translocación se emplearon secuencias con y sin capacidad para insertarse diseñadas por ordenador y testadas experimentalmente con anterioridad (Saaf et al, 1998).

### **r.1.4 p7B se inserta de forma co-traduccional en membranas del ER con una topología N-t citoplasmático/C-t luminal**

Una vez establecido que p7B es una proteína integral de membrana y que presenta un único dominio de anclaje, se planteó el estudio de su mecanismo de integración en membranas así como de su topología. La integración de proteínas en microsomas derivados del ER puede monitorizarse por glicosilación (apartado ex.3.1) (Johnson et al, 1999).

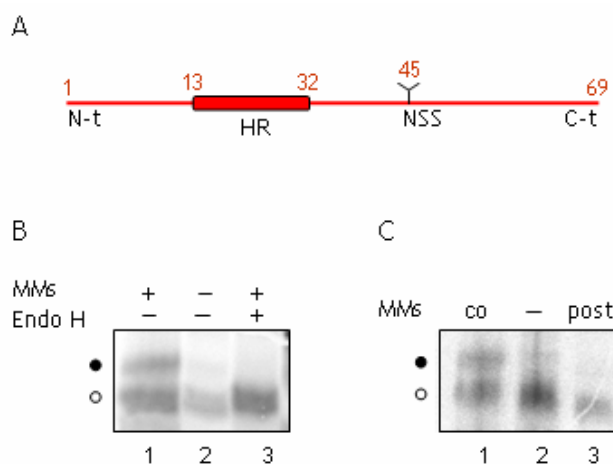
Asociación y topología de p7B del MNSV



**Figura r.1.3. Inserción de la secuencia hidrofóbica de p7B en membranas biológicas.** **A:** La inserción en membranas de la secuencia introducida en el dominio P2 de Lep provoca la glicosilación únicamente de G1 (izquierda) mientras que su translocación (derecha) permite que tanto G1 como G2 sean glicosiladas. **B:** Electroforesis (SDS-PAGE) y posterior autorradiografía de las quimeras de Lep traducidas *in vitro* en presencia (+) y ausencia (-) de membranas microsomales (MMs). Los controles de translocación (carrera 1) y de inserción (carrera 2), clones #67 y #68 en la referencia (Saaf et al, 1998), fueron cedidos por el laboratorio del Profesor G. von Heijne. Las carreras 3 y 4 muestran las traducciones de las construcciones que presentan los aminoácidos 13-32 de la secuencia de p7B. Las fracciones proteicas no glicosiladas se indican con un círculo vacío mientras que las formas mono y doble glicosiladas con uno y dos círculos negros respectivamente. La secuencia introducida en P2 en cada una de las construcciones empleadas se muestra en la parte inferior de la figura.

p7B presenta una diana natural de glicosilación (Asn-Ser-Ser) en su extremo carboxilo terminal concretamente en el aminoácido 45, aproximadamente a 13 aminoácidos del final de la región TM predicha por métodos computacionales (figura r.1.4 A). Los niveles de glicosilación esperados (si la topología de la proteína coincide con aquella predicha por los programas) no serán por tanto muy elevados debido a que la distancia mínima requerida para que se produzca una glicosilación eficiente desde el extremo luminal de un fragmento TM hasta el sitio aceptor se encuentra alrededor de 12-13 aminoácidos (Nilsson & von Heijne, 1993). A pesar de esto se obtuvieron unos niveles de glicosilación significativos tras la traducción *in vitro* de la secuencia de p7B en presencia de microsomas (figura r.1.4 B carrera 1). Indicando que la proteína se inserta de manera cotraduccional en las membranas y aparentemente con una topología N-t citoplasmático/C-t luminal. Como controles se incluyen los resultados de las traducciones tras el tratamiento con endoglicosidasa H (Endo H), enzima

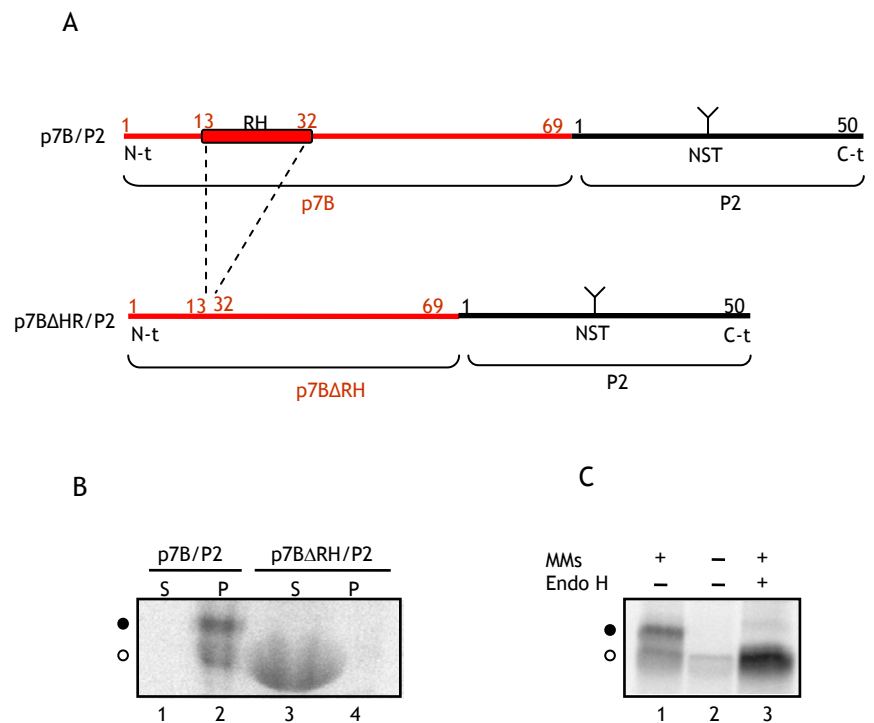
que se encarga de eliminar los azúcares (figura r.1.4 B carrera 3), y en ausencia de membranas (figura r.1.4 B carrera 2). Para averiguar si la inserción de p7B del MNSV en membranas se puede dar también post-traduccionalmente, es decir, que la proteína una vez finalizada su síntesis y liberada de los ribosomas pudiera insertarse en las membranas y ser entonces glicosilada, tras la traducción *in vitro*, en ausencia de membranas la síntesis proteica se bloqueó empleando cicloheximida y a continuación se añadieron los microsomas (figura r.1.4 C). En este caso p7B no fue glicosilada, lo que demuestra que esta MP no es capaz de insertarse en membranas derivadas del ER de forma post-traducciona



**Figura r.1.4. Mecanismo de inserción de p7B en membranas microsomales.** A. Representación esquemática de la proteína p7B. Se indica el aminoácido de inicio y fin de la región hidrofóbica (HR) y la secuencia de la diana de glicosilación (NSS) destacando la posición de la asparragina glicosilable. B. Traducción de p7B en presencia (carrera 1) y ausencia (carrera 2) de membranas. Carrera 3, traducción de la secuencia de p7B en presencia de membranas y posterior tratamiento con endoglicosidasa H (Endo H). C. Adición de membranas a la traducción de manera co-traducciona (carrera1) o post-traducciona (carrera 3). En la carrera 2 se muestra como control de glicosilación el resultado de la traducción en ausencia de membranas. Un círculo blanco indica ausencia de glicosilación y un círculo negro muestra la proteína glicosilada.

Para comprobar que la integración en membranas de p7B se debe a su único dominio TM, se diseñó una construcción donde en primer lugar se eliminó el sitio aceptor de glicosilación natural de p7B y posteriormente, se fusionaron al extremo C-t de la proteína los 50 primeros aminoácidos del dominio P2 de Lep (los cuales contienen una diana de glicosilación) para obtener la quimera p7B/P2 (figura r.1.5 A). Tras la eliminación de la región comprendida entre los residuos 13-32 se obtuvo p7B $\Delta$ HR/P2, una versión de la quimera carente de dominio hidrofóbico. Los experimentos de transcripción/traducción *in vitro* de estas dos construcciones fueron realizados en presencia de MMs y metionina marcada con <sup>35</sup>S. Tras la centrifugación de la mezcla de traducción a 100.000 g, se analizó la presencia de p7B en el sedimento (fracción de membranas) y en el sobrenadante (figura r.1.5 B). La MP del MNSV fue recuperada junto a los microsomas únicamente cuando contenía la secuencia hidrofóbica, demostrándose así el papel de esta región como dominio de anclaje a la membrana. Una banda de mayor peso molecular, debida a la glicosilación de P2, fue observada debido a que la quimera p7B/P2 fue traducida junto a MMs, lo que indicaría una orientación de la construcción mayoritariamente C-t luminal también en esta quimera. La naturaleza de esta banda se comprobó de nuevo mediante tratamiento con Endo H y traduciendo la construcción en ausencia de membranas (figura r.1.5 C). La existencia de una población de moléculas con la topología invertida no es descartable dada la presencia de un cierto porcentaje de proteína no glicosilada.

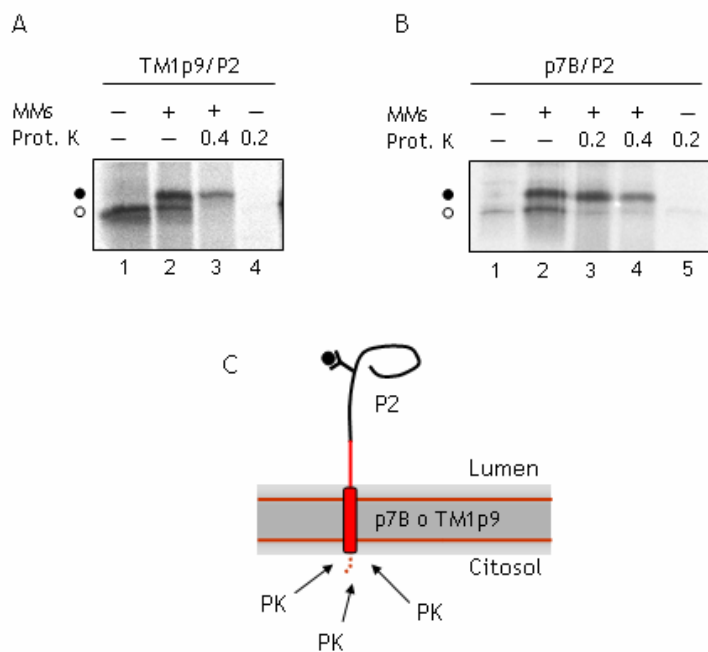
Para confirmar la topología de la quimera p7B/P2, el producto de la transcripción/traducción *in vitro* fue tratado con PK. La digestión con PK degrada aquellos segmentos de las proteínas de membrana que se encuentren en el exterior de los microsomas, mientras que los dominios que se encuentren orientados hacia el lumen o insertados en la bicapa quedan protegidos (sección ex.3.2). Como puede verse en la figura r.1.6 B, el tratamiento con PK produjo una versión de p7B/P2 glicosilada de un tamaño ligeramente menor, únicamente el extremo N-t (10-12 aminoácidos) estaría siendo degradado por la proteasa. La banda no glicosilada es digerida casi por completo tras la adición de PK, lo que sugiere que hay un porcentaje de moléculas (cercano al 30%) que no se están integrando en la membrana correctamente o que presentan una topología invertida. El porcentaje de glicosilación se obtuvo comparando la fracción glicosilada frente a la glicosilada más la no glicosilada en geles de SDS-PAGE.



**Figura r.1.5. Importancia de la región hidrofóbica de p7B para el direccionamiento e inserción de la proteína en membranas.** **A.** Representación esquemática de las construcciones utilizadas. **B.** Análisis del sobrenadante (S) y sedimento (P) obtenidos tras la ultra-centrifugación de la mezcla de traducción de las construcciones p7B/P2 y p7BΔRH/P2. **C.** La traducción en ausencia de membranas (carrera 2) así como el tratamiento con Endo H (carrera 3) eliminan la banda de mayor peso molecular que se observa en la traducción de p7B/P2 en presencia de MMs (carrera 1), lo que confirma que el dominio C-t de dicha quimera está siendo translocado al lumen debido a la topología adoptada por p7B. El círculo blanco indica ausencia de glicosilación, y el círculo negro proteína glicosilada.



Asociación y topología de p7B del MNSV



**Figura r.1.6. Tratamiento de p7B/P2 con Proteínasa K.** **A.** Determinación de la topología mediante glicosilación y PK de la construcción TM1p9 (procedente de CarMV) fusionado a P2 de Lep (TM1p9/P2). La proteína no glicosilada se indica con un círculo blanco, mientras que la glicosilación con un círculo negro. **B.** Digestión con 0.2 o 0.4 mg/mL de PK de la fusión de p7B a los 50 primeros aminoácidos de P2. La banda correspondiente a la proteína glicosilada (círculo negro) generada tras el tratamiento presenta una movilidad electroforética ligeramente mayor (carrera 2 frente a 3 y 4) lo que puede deberse a la digestión del extremo N-t de p7B. La banda no glicosilada (círculo blanco) por el contrario es digerida completamente (carreras 3 y 4). Como control de la actividad de la PK se incluyó una muestra en la que la traducción se realizó en ausencia de membranas lo que provoca la completa digestión de la quimera p7B/P2. **C.** Representación esquemática de la disposición en membranas de las proteínas estudiadas y su accesibilidad a la PK.

Los resultados obtenidos indican que p7B orienta el extremo N-t al citoplasma, al igual que la proteína integral de membrana p9 del CarMV (Vilar et al, 2002). El primer fragmento TM (TM1) de p9 se dispone por tanto en la membrana del ER con la misma orientación que p7B. Con objeto de validar los resultados obtenidos con p7B se empleó una construcción que presentaba el TM1 y el dominio luminal de p9 fusionados al dominio P2 de Lep (TM1p9/P2). Dicha quimera fue sometida a transcripción/traducción *in*

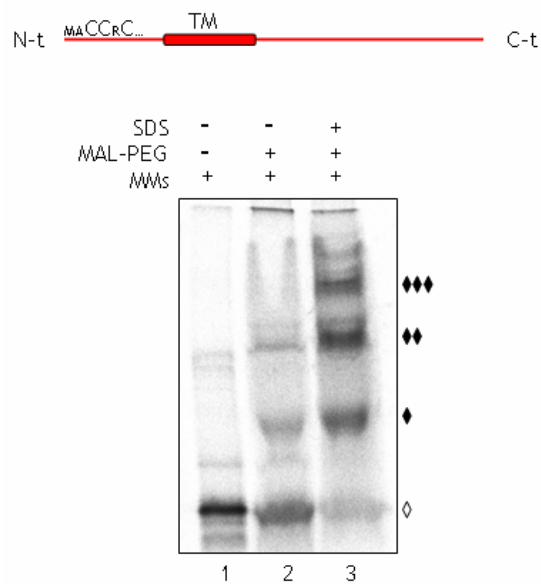
*in vitro* y posterior tratamiento con PK (figura r.1.6 A). TM1p9/P2 es glicosilado en presencia de membranas (carrera 2) y la adición de PK no degrada su extremo C-t ya que se encuentra translocado al lumen de los microsomas (carrera 3), pero sí la banda de proteína no glicosilada, resultado que coincide con la orientación de su TM1 (figura r.1.6 C).

Como última aproximación *in vitro* al estudio de la topología de p7B se empleó una técnica de marcaje específico de Cys con Maleimida-Metoxi polietilen-glicol (MAL-PEG) (apartado ex.3.3). p7B contiene tres Cys en su extremo N-t y ninguna en el C-t (figura r.1.7), si la topología determinada hasta ahora es correcta, las Cys deberían ser accesibles al marcaje con AMS. Tras la traducción *in vitro* de p7B en extracto de germen de trigo (WG) y en presencia de membranas se añadió MAL-PEG para realizar el marcaje. A una de las muestras se le añadió SDS (carrera 3) junto al modificador de Cys como control positivo de modificación, ya que en presencia del detergente todas las Cys estarán accesibles independientemente de la topología y la estructura de la proteína. Como puede verse (figura r.1.7 carrera 2) al menos dos de las Cys de p7B son marcadas en ausencia de detergente lo que confirma la topología N-t citoplasmático C-t luminal proteína. Tras añadir SDS el nivel de marcaje aumenta, lo cual puede deberse a que la estructura del dominio N-t no facilite la unión del MAL-PEG. De nuevo, no es descartable que exista una población de moléculas con una topología invertida.

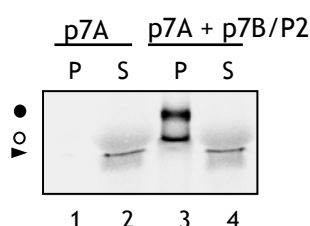
### r.1.5 Efecto de la presencia de p7A en la topología de p7B

Para el CarMV (virus modelo del género *Carmovirus*) se ha postulado que puede existir una interacción entre las dos MPs p7 y p9 (Vilar et al, 2002). Para comprobar si hay un efecto de p7A (del MNSV) sobre la topología de p7B se realizaron experimentos de co-traducción de estas dos proteínas. Los mRNA correspondientes a p7A y p7B/P2 fueron transcritos *in vitro* de manera independiente para posteriormente, traducir ambas proteínas de manera conjunta (se empleó p7B/P2 y no p7B para poder diferenciar las dos proteínas en su análisis electroforético). Tras la traducción se sometió a las muestras a ultracentrifugación para aislar la fracción de membranas y la fracción soluble, a continuación se analizaron ambas fracciones mediante SDS-PAGE y posterior autorradiografía. p7A como era esperado se localiza en la fracción soluble (figura r.1.8 carreras 1 y 4), p7B/P2 sedimenta junto a

los microsomas y mantiene la banda de glicosilación (carrera 3), lo que sugiere que el extremo C-t de la proteína es translocado incluso cuando la proteína es traducida *in vitro* en presencia de la MP soluble del virus p7A.



**Figura r.1.7. Marcaje específico de Cys en p7B.** Arriba. Esquema de la secuencia de p7B donde se indica la localización de las Cys (C) y del dominio transmembrana (TM) de p7B. Tras la traducción de la proteína se añadió MAL-PEG a una concentración final de 40mM. Hasta dos Cys son marcadas en ausencia de SDS (carrera 2) y las tres cuando se añadió el detergente (carrera 3). Un rombo blanco señala la fracción de proteína que no se encuentra marcada; uno, dos o tres rombos negros indican marcaje de una, dos o tres Cys respectivamente. Los bajos niveles de glicosilación se deben a que la traducción se realizó en WG.



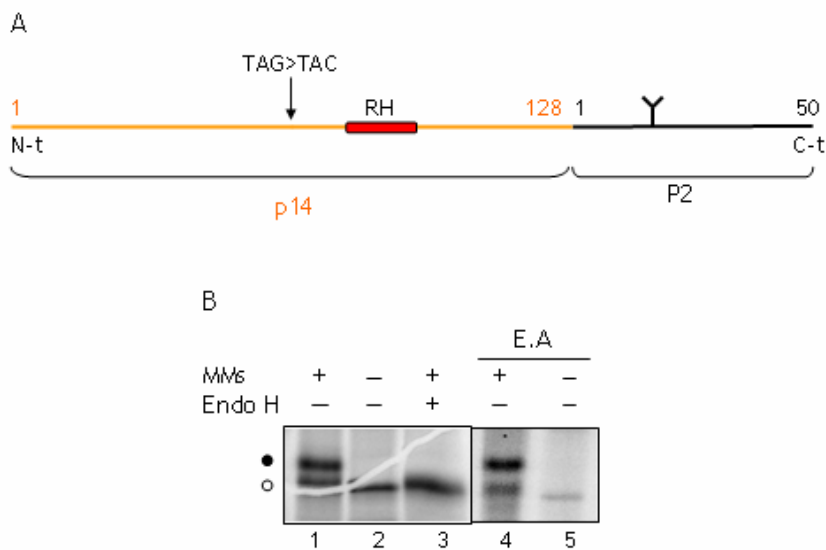
**Figura r.1.8. Efecto de p7A sobre la topología de p7B.** Análisis del sedimentado (P) y el sobrenadante (S) tras la ultracentrifugación de las mezclas de traducción de p7A (carreras 1 y 2) y p7A + p7B/P2 (carreras 3 y 4). Las formas no glicosilada y glicosilada de p7B/P2 se indican mediante un círculo vacío y uno lleno respectivamente; p7A con una cabeza de flecha.

### r.1.6 Inserción y topología en microsomas de p14

El genoma del MNSV presenta dos MPs situadas en pauta, separadas únicamente por un codón de parada ámbar (TAG). Se ha postulado que una fusión de estas dos proteínas podría darse si se omitiera esta parada (*read-through*), obteniéndose una proteína de aproximadamente 14 kDa, p14, que realizaría conjuntamente las funciones tanto de p7A como de p7B (Riviere & Rochon, 1990) de forma análoga a lo que ocurre en este virus con las polimerasas, en las que la introducción de un residuo de Tyr en la traducción del codón ámbar convierte a la helicasa p29 en la polimerasa p89. A pesar de que no se han encontrado pruebas de que p14 participe en el ciclo infectivo del MNSV su existencia no debe ser descartada. Es por ello por lo que se decidió estudiar la capacidad para insertarse en membranas de una hipotética p14 así como su topología.

Para obtener p14 el codón ámbar fue sustituido por un codón de Tyr (TAC), cambio generalmente observado *in vivo* en aquellos virus en los que se producen procesos de *read-through*, generándose así una fusión entre p7A y p7B. Al igual que con p7B, la diana natural de glicosilación de p14 fue eliminada y los 50 primeros aminoácidos del dominio P2 de Lep fusionados al extremo C-t de p14 (p14/P2). El resultado de la transcripción/traducción *in vitro*, seguida de ultracentrifugación de p14/P2 fue analizado por SDS-PAGE y posterior autorradiografía. Como se puede ver en la [figura r.1.9](#) esta quimera es glicosilada cuando la traducción se realiza en presencia de membranas (carrera 2), resultado confirmado tras el tratamiento con endo H (carrera 3). Para verificar la integración de esta construcción en membranas

se realizó una extracción alcalina antes de que los microsomas fueran aislados mediante ultracentrifugación (carreras 4 y 5). Estos resultados demuestran que, en el caso de que p14 exista, ésta se asocia a las membranas como una proteína integral de membrana y adopta una topología fundamentalmente N-t citoplasmático/C-t luminal, al igual que p7B. Es interesante destacar que esta topología permite localizar el dominio de unión a RNA en el citoplasma (Navarro et al, 2006) lo que permitiría la interacción con el genoma viral.

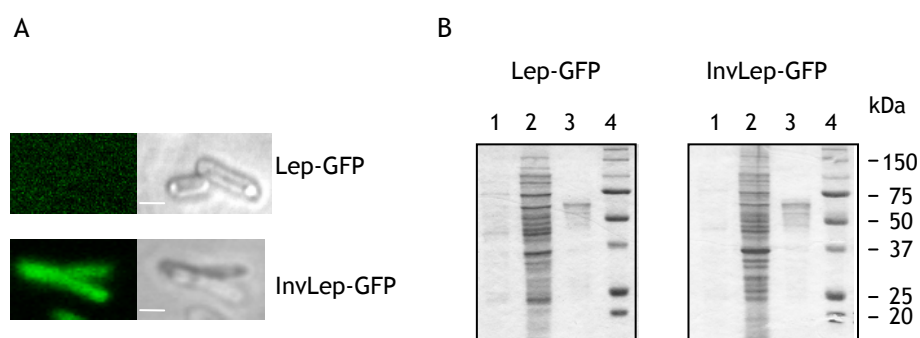


**Figura r.1.9. Inserción y topología de p14.** A. Esquema de la construcción p14/P2. Para obtener p14 el codón de parada TAG localizado entre p7A y p7B fue substituido por TAC (Tyr). B. Traducción *in vitro* de p14/P2 en presencia (+) o ausencia (-) de membranas (MMs) y Endo H. En las carreras 4 y 5 las muestras fueron sometidas a una extracción alcalina (EA) para confirmar la naturaleza de p14 como proteína de membrana.

### r.1.7 Topología de p7B en membranas de *E.coli*

Para obtener información sobre la topología de p7B en membranas celulares se emplearon fusiones a la GFP como marcador topológico en membranas de *E. coli*. La GFP es capaz de plegarse de manera correcta cuando se encuentra en un ambiente reductor (Feilmeier et al, 2000), por esta razón

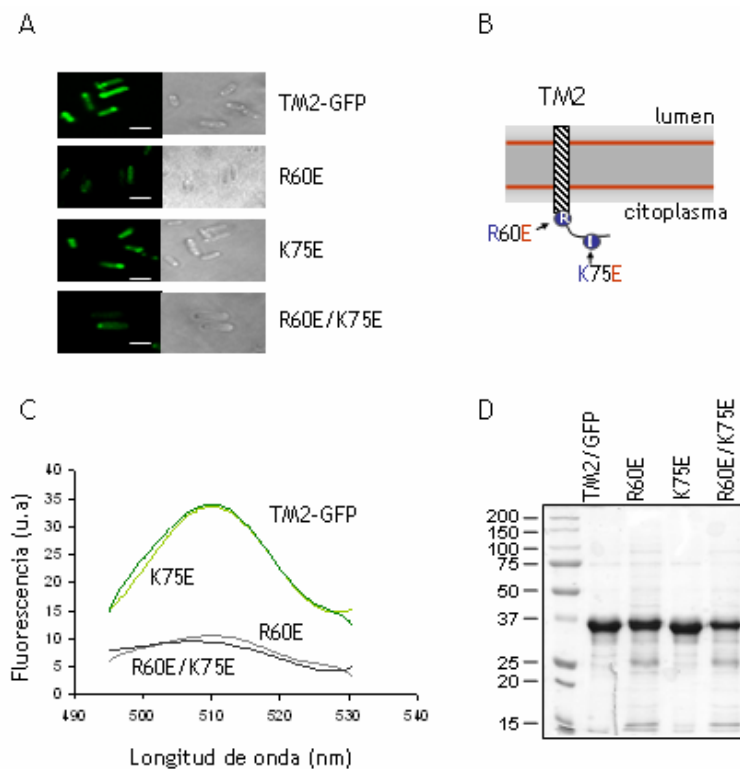
fusiones a proteínas de membrana que localicen la GFP en el citoplasma son fluorescentes mientras que aquellas que exponen la GFP al periplasma no lo son (apartado ex.3.4) (Drew et al, 2006; Drew et al, 2002). Como controles en el experimento se utilizaron dos fusiones entre una proteína de membrana y la GFP, que presentan topologías opuestas, Lep-GFP (C-t periplásmico) e InvLep-GFP (C-t citosólico), cedidas por el laboratorio del Profesor Gunnar von Heijne. Como era de esperar no se observa fluorescencia bajo el microscopio confocal de aquellas células que expresan Lep-GFP mientras que en aquellas expresando InvLep si (figura r.1.10 A).



**Figura r.1.10: Fusión de GFP a proteínas de membrana.** A. Imágenes obtenidas con el microscopio confocal de las fusiones de Lep e InvLep a GFP. A la derecha se muestran las imágenes obtenidas con luz blanca mientras que a la izquierda aquellas obtenidas con luz UV. La barra corresponde a 1  $\mu\text{m}$ . B. Sobre-expresión y purificación de las construcciones con GFP. Tinción con Coomassie de geles de SDS-PAGE que contienen: carrera 1 células sin inducir, carrera 2 células inducidas, carrera 3 proteína purificada empleando cromatografía de  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA, carrera 4 marcador de peso molecular.

La inversión de la topología de proteínas de membrana en *E. coli* puede obtenerse, al menos parcialmente, optimizando la secuencia de aminoácidos de acuerdo a la regla conocida como *positive-inside rule* (von Heijne, 1986) según la cual los dominios extramembrana de las proteínas de membrana presentan una distribución sesgada por lo que respecta a los residuos cargados, tendiendo los dominios que presentan un mayor número de lisinas y argininas a orientarse hacia el citoplasma (apartado i.9.2). Para estudiar si las proteínas de membrana virales seguían las mismas reglas

topológicas cuando eran expresadas en *E. coli*, la GFP fue fusionada al extremo C-t del TM2 de p9 de CarMV (TM2p9-GFP) (figura r.1.11 B). Dicha construcción debido a la topología que adopta TM2 es fluorescente. En el extremo C-t de p9 hay dos aminoácidos cargados positivamente (Arg 60 y Lys 75) cuya sustitución por glutamato provoca la inversión de la topología de TM2 con lo que se pierde la fluorescencia (figura r.1.11 A y C).



**Figura r.1.11: Inversión de topología de fusiones entre TM2 de p9 y GFP.** A: Imágenes obtenidas bajo el microscopio confocal de las fusiones a GFP. A la derecha se muestran las imágenes obtenidas con luz blanca mientras que a la izquierda las obtenidas con luz UV. La barra corresponde a 5 µm. B: Esquema de la topología de TM2 de p9 (CarMV). Se muestra la localización de las cargas y los cambios realizados. C: Espectro de emisión de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 485 nm. D: SDS-PAGE de muestras obtenidas tras la purificación con Ni<sup>2+</sup>-NTA de la expresión de las fusiones TM2-GFP.

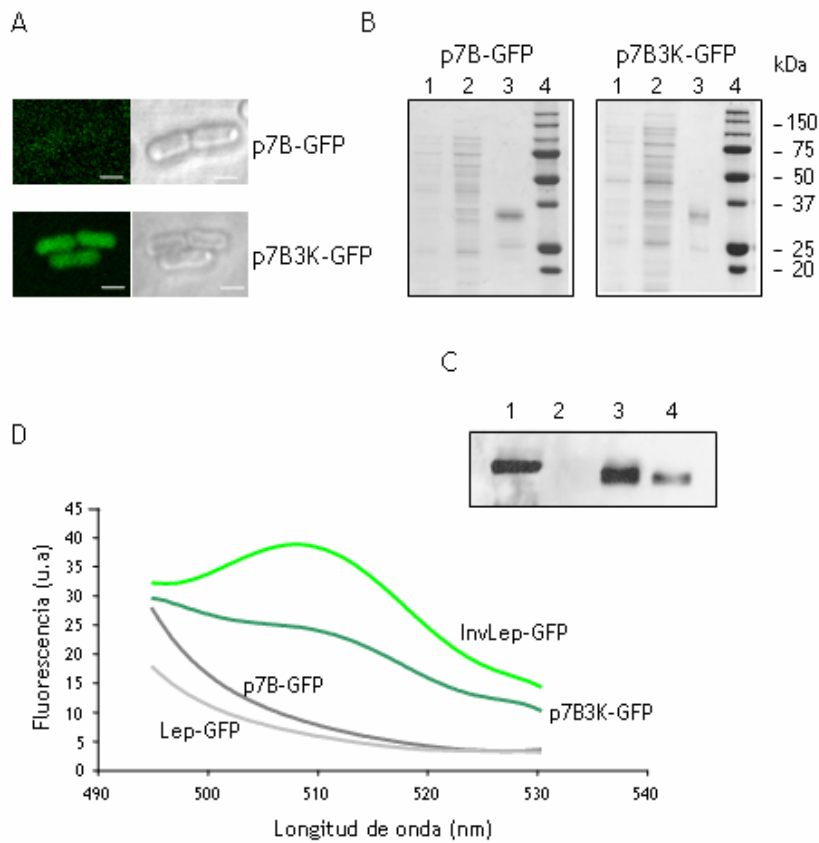
La fusión de la GFP al extremo C-t de p7B mostró no ser fluorescente bajo el microscopio (figura r.1.12 A y D). Análogamente a Lep e InvLep una versión de p7B-GFP con la topología invertida debería ser fluorescente. p7B presenta una carga positiva en ambos dominios hidrofílicos (amino y carboxilo-terminal). Se decidió por tanto crear un mutante que variase el balance de cargas a ambos lados de la membrana, para ello tres Lys fueron insertadas en el dominio C-t tras el residuo 32, justo al final del segmento TM (p7B3K-GFP). Los programas de predicción mencionados anteriormente predicen para p7B3K-GFP una topología invertida frente a p7B-GFP, es decir, N-t luminal/C-t citoplasmático. La expresión de p7B3K-GFP demostró ser fluorescente (figura r.1.12), confirmando la topología para la versión silvestre de p7B-GFP N-t citoplasmático/C-t luminal.

Todas las proteínas de fusión empleadas fueron sobre expresadas y purificadas empleando cromatografía de afinidad por Ni<sup>2+</sup> y analizadas por SDS-PAGE para verificar su expresión (figura r.1.10 B, r.1.11 D y r.1.12 B). La presencia de la GFP en estas construcciones se comprobó mediante inmunodetección con un anticuerpo frente a la GFP (figura r.1.12 C). La densidad óptica de los cultivos se empleó para normalizar la actividad de las fusiones a GFP en el fluorímetro.

Los espectros de emisión de las diferentes construcciones empleadas confirman los resultados observados en el microscopio confocal (figuras r.1.11 C y r.1.12 D), y apuntan a una topología de p7B N-t citoplasmático/C-t luminal, al igual que los experimentos de glicosilación y PK anteriormente descritos.



Asociación y topología de p7B del MNSV



**Figura r.1.12: Topología de p7B en membranas de *E. coli*.** **A:** Imágenes obtenidas bajo el microscopio confocal de las fusiones p7B-GFP y p7B3K-GFP. Derecha imágenes obtenidas con luz blanca, izquierda las obtenidas con luz UV. La barra corresponde a 1  $\mu\text{m}$ . **B:** Sobre-expresión y purificación de las construcciones con GFP. Tinción con Coomassie de geles de SDS-PAGE que contienen: carrera 1 células sin inducir, carrera 2 células inducidas, carrera 3 purificación empleando cromatografía de  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA, carrera 4 marcador de peso molecular. **C:** Inmunodetección con anticuerpo contra la GFP, 1 InvLep-GFP, 2 Lep-GFP, 3 p7B3K-GFP, 4 p7B-GFP. El anticuerpo no puede reconocer aquellas versiones de la GFP que no presentan un plegamiento correcto. **D:** Espectro de emisión de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 485 nm.

### r.1.8 Discusión

En el presente capítulo se estudió la inserción y topología en membranas de la MP p7B del MNSV. Se ha demostrado previamente que p7B junto a p7A, funcionando en *trans*, son suficientes para facilitar el movimiento célula-célula (Genoves et al, 2006). p7A es capaz de unir RNA de forma cooperativa y sin especificidad de secuencia, se cree que *in vivo* une el genoma viral para su transporte a las células adyacentes, mientras que p7B estaría asociada a la red celular de membranas (Navarro et al, 2006). Dado que las MP p7A y p7B trabajan de manera acoplada en el movimiento del genoma del virus, es importante averiguar como se dirige y dispone p7B en las membranas para conocer como cooperan estas dos proteínas en el transporte del RNA viral. Como punto de partida se emplearon diferentes programas de predicción de proteínas de membrana; todos ellos identificaron a p7B como una proteína integral de membrana con un único segmento TM entre los residuos 13-20 y 32-38, dependiendo del programa utilizado. Todos los programas, que además de identificar los fragmentos TM son capaces de predecir su topología, localizan el extremo amino terminal de la proteína en el citosol y en consecuencia el carboxilo terminal en el lumen. La veracidad de los resultados obtenidos mediante programas de predicción está relacionada con el número de éstos que coinciden en el resultado (Nilsson et al, 2000). Por tanto las predicciones obtenidas para p7B se pueden considerar como muy fiables, computacionalmente hablando.

Tras la traducción *in vitro* de p7B en presencia de membranas, éstas se aislaron mediante ultracentrifugación. p7B sedimenta junto a los microsomas incluso tras el tratamiento con urea 8M o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, lo que confirma que p7B es una proteína integral de membrana capaz de dirigirse a las membranas por sí sola, a pesar de carecer de secuencia señal. La capacidad del putativo dominio TM para insertarse en la bicapa se confirmó empleando el sistema *in vitro* de mapeo por glicosilación (apartado ex.1.2). La topología de la proteína en membranas microsomales se estudió mediante glicosilación, digestión con PK, marcaje específico de cisteínas y finalmente *in vivo* con fusiones a GFP. Los resultados indican que p7B se orienta fundamentalmente con su extremo amino terminal hacia el citosol y el carboxilo terminal hacia el lumen tanto en microsomas derivados del ER como en membranas de *E.coli*.

Estudios topológicos empleando técnicas bioquímicas han sido realizados con otras MPs de virus de plantas. La proteína p9 del CarMV tiene dos segmentos TM y ambos extremos (N-t y C-t) situados en el citoplasma. Más recientemente se ha descrito a la proteína X2 del virus de las manchas necróticas del tomate (*Tomato ring spot virus*, ToRSV) como una proteína integral de membrana con tres dominios TM (Zhang et al, 2005). Hasta ahora la MP p6 del BYC era la única identificada con un único fragmento TM (Peremyslov et al, 2004). p7B del MNSV y p6 presentan ambas solo un dominio TM pero tienen una topología opuesta, mientras que en p6 el C-t es citosólico en p7B es el dominio N-t de la proteína el que se orienta hacia el citosol. Teniendo en consideración el actual modelo para el transporte del genoma viral entre células adyacentes en virus del género *Carmovirus* (sección i.3.1) y la topología de p6 del BYC la translocación al lumen del extremo C-t de p7B no era de esperar. Se ha propuesto que la interacción entre la MP soluble con capacidad para unir RNA y su pareja de membrana (en el caso del CarMV p7 y p9) debe tener lugar a través del extremo C-t de la proteína de membrana (Vilar et al, 2002). Esta aparente discrepancia entre p7B del MNSV y p6 o p9 del BYV y CarMV respectivamente, admite al menos cuatro posibles explicaciones.

1. Proteínas homologas con diferente orientación de los extremos C-t han sido descritas tanto en organismos procariontes (Daley et al, 2005) como en eucariontes (Kim et al, 2006). Es más, a pesar de que para la mayoría de proteínas de membrana cabría esperar una única topología, una topología "dual" (una proteína que se inserta en las membranas con dos posibles orientaciones) se ha propuesto como un paso temprano en la evolución de las proteínas de membrana (Rapp et al, 2006). Situación no descartable a la vista de los resultados obtenidos.

2. El dominio N-t presenta una longitud mayor en p7B que en las otras dos MP (p6 BYV y p9 CarMV). Este dominio extramembrana podría posibilitar la interacción con otros componentes (virales o de la planta) requeridos para el movimiento intra- e inter-celular del virus.

3. La modificación de las membranas celulares provocada por los virus de plantas podría explicar una diferente topología *in vivo*. De hecho durante la infección las membranas del ER agregan para formar vesículas conocidas como "factorías virales" (Heinlein et al, 1998; Reichel & Beachy, 1998) que contienen RNA viral, replicasas virales y MPs (Mas & Beachy, 1999). Estos

complejos de replicación han sido también localizados en el tonoplasto, en los que se ha sugerido una reorganización de las membranas inducida por la infección viral (Hagiwara et al, 2003).

4. Tanto p7A como p7B, son traducidas, en la planta, a partir del mismo RNA sub-genómico. La ORF de p7A precede a la de p7B, por lo que se supone que p7A debe ser sintetizado antes que p7B y que p7A es más abundante que su pareja de membrana en células infectadas por el MNSV, igual que ocurre para las MPs del TCV (Li et al, 1998). La presencia de p7A podría modificar la topología de p7B en la planta.

La existencia de p14, aunque improbable, no debe ser excluida. Unas pocas copias de p14 serían suficientes para anclar a la membrana el complejo formado por el genoma viral (ssRNA+) y un número indeterminado, aunque probablemente elevado, de copias de p7A. Esta complementación entre p7A y p14 no ha podido ser demostrada *in vivo* (Genoves et al, 2006), si embargo ha de tenerse en consideración el hecho de que las proteínas de membrana de plantas son expresadas en niveles moderados o bajos (en comparación con los obtenidos en los ensayos de complementación) y que los niveles, localización y sincronización de expresión de parejas funcionales (como lo serían p7A y p14) han de ser regulados con exactitud, lo que podría explicar el hecho de que hasta la fecha no se haya podido detectar *in vivo* la presencia de p14.

## R.2 ASOCIACIÓN Y TOPOLOGÍA DE LA MP p9 DEL TCV EN MEMBRANAS DEL ER

Tanto el MNSV como el CarMV, ambos miembros del género *Carmovirus*, presentan dos pequeñas MPs, una de las cuales puede unir RNA mientras que la otra es capaz de interactuar con la membrana (p7B en el caso del MNSV y p9 en el CarMV). Si bien ambas proteínas son proteínas integrales de membrana, p7B y p9 se diferencian en el número de fragmentos TM y en la localización de su extremo carboxilo terminal como se ha demostrado en el capítulo anterior. Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de transporte de los virus del género *Carmovirus* se inició el estudio de la MP p9 del virus del arrugamiento del nabo (apartado i.5.2).

### r.2.1 Análisis de la secuencia de p9

El TCV pertenece al igual que el CarMV y el MNSV al género *Carmovirus*, su secuencia codifica para dos MPs de pequeño tamaño, p8 y p9 (apartado i.5.2). p8 se ha identificado como una proteína con capacidad para unir RNA de forma cooperativa y sin especificidad de secuencia (Wobbe et al, 1998); p9, MP de 106 aminoácidos, sería en un sistema análogo al descrito para el MNSV y el CarMV, la MP encargada de interactuar con las membranas de ER.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de p9 (código de acceso AAP78488 en la base de datos del NCBI) realizado con varios de los programas de identificación de dominios TM disponibles en Internet e introducidos en el capítulo anterior (apartado ex.1.1) muestra resultados dispares (tabla r.2.1). p9 contiene dos regiones hidrofóbicas, la primera (HR1) entre los aminoácidos 1 y 20, y la segunda entre los residuos 33 y 61 (HR2). No todos los algoritmos empleados identifican a ambos dominios hidrofóbicos como regiones TM. Es más, el TMHMM (Krogh et al, 2001) no considera a ninguna de estas regiones hidrofóbicas como dominio de anclaje a la membrana, la proteína, según este programa, sería una proteína soluble.

Tabla r.2.1. Análisis de la secuencia de p9 del TCV

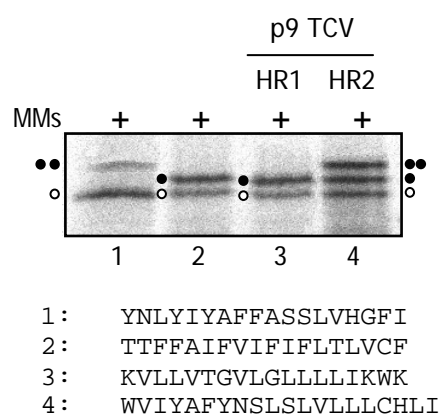
PROGRAMA	fsTM (aa inicio/aa fin)
DAS	2 (5/18 - 40/58)
HMMTOP	1 (33/52)
MEMSAT	1 (38/57)
PHD	2 (11/16 - 37/58)
SOSUI	2 (1/18 - 39/61)
SPLIT	2 (2/18 - 37/59)
TMHMM	0
TMPred	2 (1/19 - 38/57)
TopPRED	2 (1/21 - 37/57)

En la columna de la izquierda se muestran los programas empleados, en la de la derecha el número de fragmentos transmembrana (fsTM) detectados y los aminoácidos (aa) que los constituyen entre paréntesis.

El análisis de las regiones hidrofóbicas detectadas empleando el  $\Delta G$  Prediction Server (Hessa et al, 2005; Hessa et al, 2007) otorga para la HR1 (aminoácidos 3-20) un valor de  $\Delta G_{app}$  de -0.65 y para HR2 (aminoácidos 38-57) +0.58 kcal/mol. Es decir, el HR1 tendría una ligera tendencia a insertarse mientras que el HR2 no debería ser reconocido por la maquinaria del translocón como dominio TM.

### r.2.2 Inserción en membranas biológicas de las HR1 y HR2 de p9

Para estudiar la capacidad de cada una de estas dos regiones hidrofóbicas para insertarse en la bicapa se empleó el sistema de mapeo por glicosilación (apartado ex.1.2) (Hessa et al, 2005; Hessa et al, 2007), sistema empleado anteriormente para el estudio de la capacidad de inserción de la HR de p7B del MNSV (figura r.2.1 A). La traducción *in vitro* de las quimeras de Lep que presentaban las regiones HR1 (aminoácidos 3-20) y HR2 (aminoácidos 38-57) insertadas entre las dianas G1 y G2 produjo una versión de Lep monoglicosilada en el caso de HR1 (figura r.2.1 B, carrera 3) y una mezcla de poblaciones de moléculas de proteína mono- y doble-glicosiladas cuando se empleó HR2 de p9 (carrera 4).

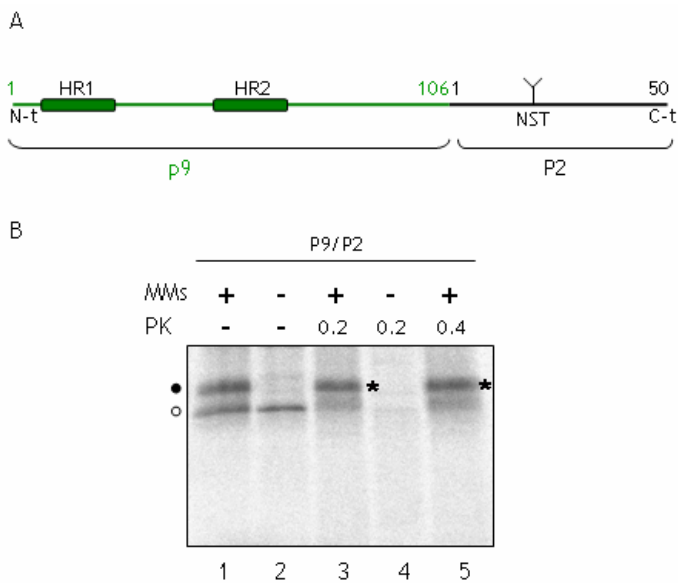


**Figura r.2.1. Inserción de HR1 y HR2 de p9 en membranas microsomaes.** Resultado de la transcripción y traducción *in vitro* de las quimeras de Lep que contienen entre G1 y G2 la secuencia control de translocación (carrera 1) o de inserción (carrera 2), cedidas por el laboratorio del Profesor von Heijne (Saaf et al, 1998). En las carreras 3 y 4 se muestra el resultado cuando se emplearon los dominios HR1 y HR2 de p9 del TCV respectivamente. Abajo se muestran las secuencias insertadas en el dominio P2 en cada una de las quimeras ensayadas. Un círculo blanco indica no glicosilación, uno o dos círculos negros indican mono o doble glicosilación respectivamente.

### r.2.3 Inserción y topología en membranas microsomaes de la proteína de movimiento p9 del TCV

Tanto las predicciones como los resultados de mapeo por glicosilación en el contexto de Lep señalan a p9 del TCV como una proteína integral de membrana, para comprobar si p9 realmente se comporta como una proteína de membrana y como primera aproximación al estudio de su topología se realizó un experimento de traducción *in vitro* en presencia y ausencia de microsomas y PK de la fusión entre p9 y los 50 primeros aminoácidos de P2 (p9/P2), los cuales contienen una diana de glicosilación (Ans-Ser-Thr) (figura r.2.2 A). La traducción en presencia de microsomas produjo un retraso en la movilidad electroforética de p9/P2 (figura r.2.2 B, carreras 1 y 2) lo que indica que el extremo C-t de la construcción esta siendo translocado al lumen de los microsomas. Cuando se sometió a la proteína traducida en presencia de membranas microsomaes a digestión con PK (incluso a concentraciones elevadas) sólo una porción de la proteína no glicosilada fue digerida, fracción que probablemente corresponde a proteína no insertada en la membrana. La fracción de proteína glicosilada quedó completamente

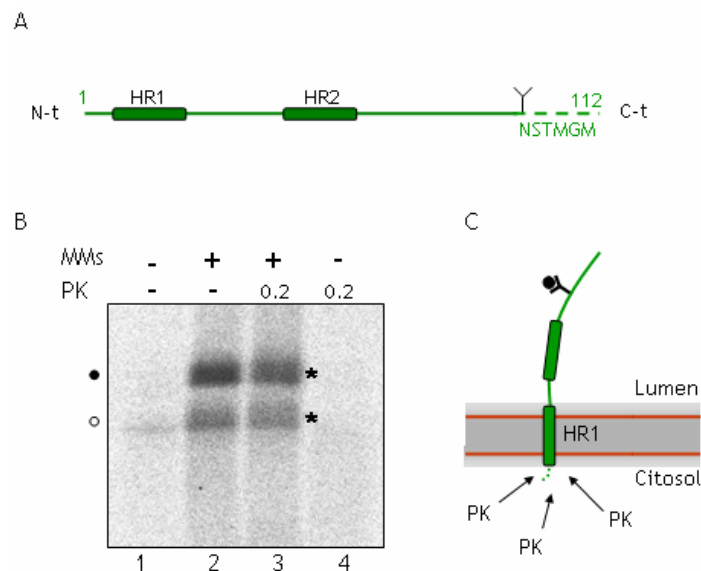
protegida por los microsomas. Estos resultados se podrían explicar al menos mediante dos tipos de inserción de la proteína en la membrana, o bien sólo se inserta la primera HR con una topología N-t citosólico o bien ambas HR son realmente segmentos TM y la proteína tiene una orientación N-t/C-t luminales. En este último caso el lazo que une HR1 y HR2 debería estar protegido frente a la digestión con PK, lo cual es poco probable. No es descartable la posibilidad de que HR2 tenga en el contexto de la proteína completa una baja eficiencia de inserción al igual que ocurre cuando se encuentra insertada en el dominio P2 de Lep (figura r.2.1), lo que avalaría el primero de los dos modelos. Situación que también explicaría la digestión en presencia de PK únicamente de la fracción de proteína no glicosilada.



**Figura r.2.2. Digestión de p9/P2 con PK.** A. Esquema de la construcción p9/P2, se muestran las dos regiones hidrofóbicas identificadas por los programas de predicción de fragmentos TM (HR1 y HR2) así como la diana de glicosilación (Y, NST) de los 50 primeros aminoácidos del dominio P2 de Lep. B. Resultado de la traducción *in vitro* de p9/P2 en presencia (+) o ausencia (-) de microsomas y de PK. La cantidad de PK en mg/mL empleada en cada caso se indica en la parte superior. Un círculo blanco indica ausencia glicosilación mientras que uno negro glicosilación, el asterisco muestra la fracción proteica resistente a la digestión con PK.



Para comprobar que los 50 aminoácidos de P2 no estaban provocando la translocación del extremo C-t, el experimento se repitió con la proteína silvestre. En este caso como marcador topológico se empleó una diana de glicosilación añadida en el extremo C-t de la proteína en el proceso de amplificación por PCR del DNA correspondiente a la secuencia de p9 (figura r.2.3 A). Al igual que cuando la proteína se tradujo fusionada a P2 la adición de membranas provoca un retraso en la movilidad electroforética, debido a la glicosilación de la diana del extremo C-t (figura r.2.3 B, carreras 1 y 2). La adición de PK no produjo digestión alguna cuando había microsomas en la mezcla de traducción (carrera 3), lo que indica que ninguna región de la proteína se encuentra expuesta al citosol, excepto quizás, el corto extremo N-t (1-3 aminoácidos), cuya digestión no puede ser monitorizada en las condiciones utilizadas de SDS-PAGE (figura r.2.3 C). Como control de la digestión se añadió PK a una carrera que no contenía membranas, en este caso la proteína es digerida completamente dado que no hay membranas que protejan frente a la actividad de la proteasa (carrera 4).

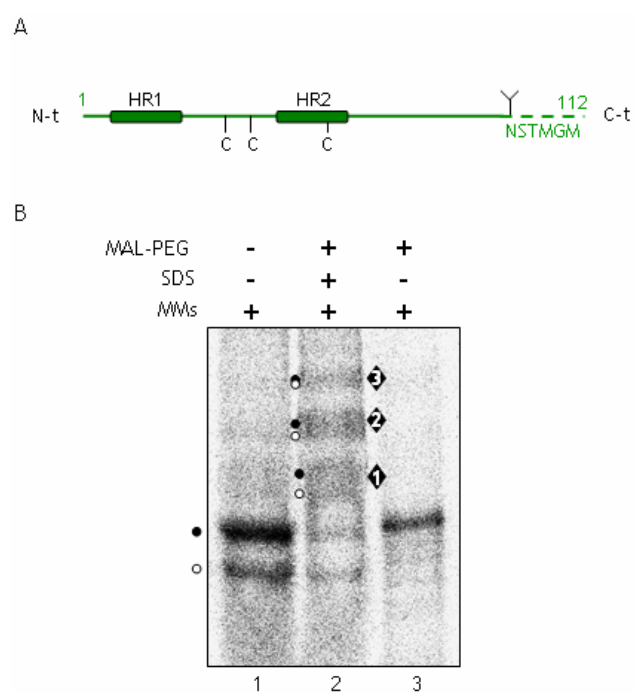


**Figura r.2.3. Topología de p9 en membranas microsomales.** A. Esquema de la proteína p9 del TCV donde se muestran los aminoácidos añadidos en la PCR en el extremo C-t, incluyendo la diana de glicosilación (Y). B. Digestión con PK de p9. El círculo blanco indica no glicosilación mientras que el negro glicosilación. El asterisco muestra la proteína resistente a la digestión con PK. C. Disposición más probable de p9 en membranas microsomales de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de glicosilación y digestión con PK.

La topología de p9 se analizó también mediante marcaje específico de Cys con Maleimida-metoxi polietilen-glicol (MAL-PEG) (apartado ex.3.3). Como se ha comentado anteriormente este reactivo es capaz de unirse específicamente al grupo -SH de las Cys que se encuentren accesibles y localizadas en el lado citosólico de las membranas microsomales. La unión de MAL-PEG produce un aumento en la masa molecular de la proteína de aproximadamente 5 kDa por Cys marcada. p9 contiene tres Cys en su secuencia, dos en el lazo que conecta las dos regiones hidrofóbicas y una tercera dentro de la HR2 (figura r.2.4 A). Tras la transcripción y traducción *in vitro* de p9 en presencia de microsomas la adición de MAL-PEG no produjo retraso alguno en la movilidad electroforética de la proteína (figura r.2.4 B, carrera 1 y 3). Sólo cuando se añadió el detergente SDS, el cual desorganiza las membranas microsomales, además de MAL-PEG las Cys de p9 pudieron ser modificadas (carrera 2). Estos resultados indican que todas las Cys se encuentran en el lumen de los microsomas o insertadas en la bicapa. Resultado que coincide con la topología determinada mediante glicosilación y digestión con PK (figura r.2.4 C). En este ensayo se empleó la versión de p9 en la que se ha insertado una diana de glicosilación en el extremo C-t, la proteína es por lo tanto glicosilada cuando se traduce en lisado de reticulocitos y en presencia de microsomas derivados del ER, glicosilación que puede observarse a pesar del marcaje con MAL-PEG.

#### **r.2.4 Inserción y direccionamiento a membranas de la HR1 de p9**

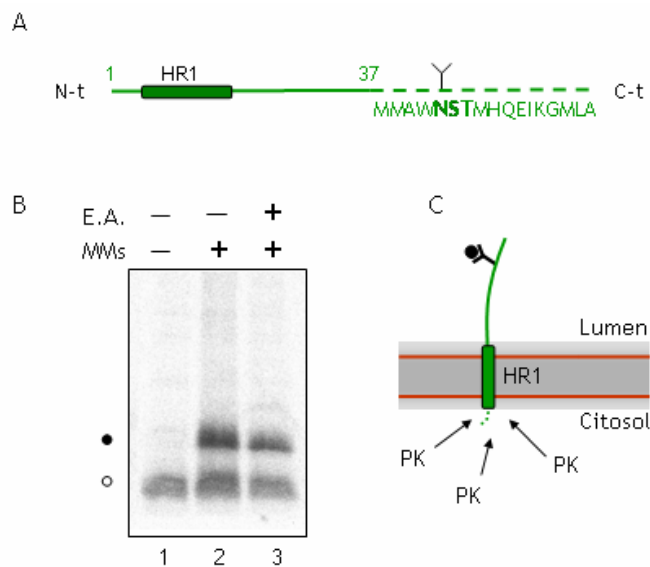
Según los resultados previos la HR1 es la responsable del anclaje y de la adopción de la topología de p9 en membranas microsomales. Una versión truncada de la proteína que contenga el extremo N-t de la proteína, HR1 y el lazo que une a los dominios HR1 y HR2 (aminoácidos 1-37) debería por tanto insertarse en membranas con la misma topología que la proteína completa.



**Figura r.2.4. Marcaje específico de Cys con MAL-PEG.** A. Esquema de la secuencia de aminoácidos de p9 que muestra la localización de las Cys y de la diana de glicosilación. B. Resultado del marcaje con MAL-PEG de la proteína p9 del TCV. La glicosilación se indica con un círculo negro y la proteína no glicosilada con uno blanco. Dentro de un rombo negro se muestra el número de Cys modificadas con MAL-PEG.

El DNA correspondiente a esta región fue amplificado mediante PCR, proceso en el cual se añadió una diana de glicosilación en el extremo C-t de la versión truncada de p9. La transcripción y traducción *in vitro* de este DNA (figura r.2.5 A) produjo una proteína capaz de glicosilarse cuando la traducción se realizó en presencia de membranas (figura r.2.5 B). Además el tratamiento con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  no liberó la proteína de los microsomas (apartado ex.2.1), lo que confirma que la HR1 es capaz de insertarse en la membrana con una orientación N-t citosólico/C-t luminal.

Asociación y topología de p9 del TCV

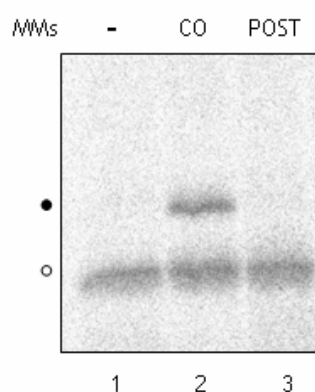


**Figura 1.2.5. Inserción en membranas de la primera región hidrofóbica de p9.** A. Representación de la proteína truncada empleada para el estudio de la capacidad de inserción y topología en membranas de la HR1. Se muestran los aminoácidos añadidos por PCR incluyendo el sitio de glicosilación (Y, NST). B. Traducción *in vitro* de los aminoácido 1-37 de p9 en presencia (+) y ausencia (-) de membranas y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La glicosilación se indica con un círculo negro la no glicosilación con uno blanco. C. Disposición en membranas de la versión truncada de p9 que contiene únicamente la RH1.

**1.2.5 Mecanismo de inserción en membranas de p9**

Una vez determinada la topología de p9 se planteó el estudio del mecanismo seguido por esta MP para insertarse en membranas. Para conocer si p9 sigue un mecanismo co-traduccional o post-traduccional (apartado 1.8) se tradujo la proteína, a la que se le ha añadido una diana de glicosilación en C-t (figura 1.2.3 A), en presencia y ausencia de membranas, para a continuación detener la traducción empleando cicloheximida. La inserción post-traduccional se analizó añadiendo microsomas, una vez parada la traducción, a las muestras traducidas en ausencia de membranas. Como puede verse en la figura 1.2.6, p9 únicamente es glicosilada (modificación que se produce acoplada a la inserción en la membrana acoplada al translocón) si las membranas son incorporadas co-traduccionalmente (carrera 2). Por lo tanto, al igual que ocurre con p7B del MNSV y con p9 del

CarMV (Sauri et al, 2007), p9 del TCV se inserta en membranas de manera co-traducciona.



**Figura r.2.6. Mecanismo de inserción de p9 en membranas del ER.** La MP p9 del TCV sólo es capaz de insertarse en los microsomas a través de la maquinaria del translocón de manera cotraducciona. En la parte superior de la figura se muestra si la adición de las membranas ha sido co-traducciona (CO) o post-traducciona (POST), carreras 2 y 3 respectivamente. Los círculos blanco y negro indican no glicosilación y glicosilación de la diana añadida en el proceso de amplificación de DNA.

### r.2.6 Discusión

Los estudios realizados hasta el momento con las MPs del género *Carmovirus* demuestran que al menos una de las dos MP que estos virus codifican en su genoma es una proteína integral de membrana (apartado i.3.1) (Vilar et al, 2002). La asociación a membranas parece ser por tanto un proceso clave en el ciclo replicativo del virus. El papel de esta interacción, MP/membrana del ER, se desconoce pero se ha propuesto que podría ser importante para el direccionamiento hacia el plasmodesmo y a través de él, del complejo formado por el RNA viral y la MP con capacidad para unir RNA.

El TCV tiene al igual que el resto de miembros del género *Carmovirus* dos pequeñas MPs, p8 y p9. La primera (p8) es capaz de unir RNA sin especificidad de secuencia, la segunda (p9) sería supuestamente la encargada de interactuar con la bicapa. p9 contiene únicamente 106

aminoácidos, dentro de los cuales se identifican dos regiones hidrofóbicas (HR1 y HR2), su secuencia y la distribución de dominios hidrofóbicos es más parecida por lo tanto a la de p9 del CarMV que no a p7B del MNSV. La MP del CarMV (p9) tiene dos dominios TM, en cambio, ninguna de las dos regiones hidrofóbicas de p9 del TCV es detectada consistentemente por los programas de predicción de fragmentos TM como un dominio capaz de insertarse en la bicapa. Cuando ambas secuencias, de manera independiente, fueron insertadas en el dominio P2 de Lep para conocer su capacidad para insertarse en la membrana, solo HR1 demostró ser reconocida eficientemente por la maquinaria del translocón como un dominio TM. Por el contrario HR2 provocó la doble glicosilación (indicativo de la translocación del dominio P2) en aproximadamente el 50% de las moléculas de Lep correctamente dirigidas a la membrana. La capacidad de HR2 para insertarse podría variar ligeramente *in vivo*, debido a la diferente composición lipídica de las membranas de la planta (Schneiter & Toulmay, 2007), y a la presencia de otras proteínas de membrana de la planta. Por otro lado, puede que HR2 requiera de HR1 para su integración en la membrana.

Los resultados de glicosilación, digestión con PK y marcaje de Cys con MAL-PEG demuestran que p9 es una proteína integral de membrana anclada a la bicapa únicamente por HR1 y con una topología N-t citoplasmático/C-t luminal. Cuando se traduce *in vitro* la proteína completa, HR2 no es capaz de insertarse, resultado que coincide con los datos obtenidos en los experimentos de mapeo por glicosilación. Es más, HR1 en ausencia de la segunda región hidrofóbica y del dominio C-t hidrofílico es capaz de insertarse en la membrana y adoptar la misma topología (N-t citoplasmático/C-t luminal) que la proteína completa, lo cual ratifica los resultados anteriores. Es interesante destacar que esta misma topología es adquirida también por la primera de las regiones hidrofóbicas de p9 del CarMV y de p7B del MNSV.

p9 al igual que sus proteínas homólogas (p7B del MNSV, y p9 del CarMV (Sauri et al, 2005)), se inserta de manera co-traduccional en la membrana empleando la maquinaria del translocón. La HR1 es probablemente la responsable de la inserción y del reconocimiento por la SRP y por tanto del direccionamiento a las membranas del ER para su inserción en la bicapa a medida que se produce la síntesis del resto de la proteína. Así, p9 carece de capacidad para insertarse en la membrana de manera post-traduccional.

La topología de p9 del TCV, especialmente la localización de su extremo C-t, podría verse afectada en la planta por la presencia de p8, proteína que se encuentra en la planta en mayor cantidad que p9 (Li et al, 1998). Si el TCV sigue el mecanismo propuesto para el CarMV p8 interaccionaría con el C-t de p9 en el citosol, lo que forzaría la inserción de la HR2 tan pronto interaccionen las dos MP ya que p8 es una proteína soluble que se localiza en el citoplasma. Esta interacción entre las dos MPs se debería producir por lo tanto antes de la completa translocación del extremo carboxilo terminal. Proceso dificultado por el mecanismo de inserción contraducciona que sigue p9, en el cual el extremo C-t de la proteína se encuentra en los estadios iniciales de su biogénesis protegido por el túnel del ribosoma cuando la HR2 tiene que ser particionada al lumen o insertada en la membrana.

No es descartable por lo tanto, que la capacidad de la HR2 para encontrarse tanto insertada como translocada represente un mecanismo del virus para poder localizar el extremo C-t en ambos lados de la membrana. Al igual que ocurriría con el MNSV, cuya topología "dual" le permitiría exponer su extremo C-t en los dos lados de la bicapa. Es razonable pensar que en virus con un tamaño genómico tan pequeño que una secuencia pueda actuar en compartimentos celulares diferentes supone una gran ventaja ya que permite a la proteína acceder a un mayor número de interacciones e influir en mayor número de procesos celulares. La interacción que se ha propuesto entre el extremo C-t de p9 y p8 se produciría una vez p9 se ha insertado completamente en la membrana y únicamente en aquellos casos en los que el HR2 actúa como un verdadero fragmento TM lo que permitiría orientar el dominio C-t de la proteína al citosol.

### R.3 ASOCIACIÓN A MEMBRANAS DE LA MP p32 DEL PNRSV

La MP del virus de los anillos necróticos del prunero (p32) forma parte de la superfamilia 30k. Al igual que otras proteínas de este grupo se ha identificado en p32 un dominio con capacidad para unir RNA sin especificidad de secuencia (RBD) (Herranz & Pallas, 2004; Herranz et al, 2005a). En cambio, la capacidad para interactuar con el ER descrita en otras proteínas de la superfamilia, no ha sido estudiada en la MP del PNRSV. Dentro de este gran grupo la proteína para la cual se tienen más datos sobre su capacidad de unión a las membranas del ER es la MP del TMV. Estudios preliminares sugieren que ésta es una proteína integral de membrana con dos fragmentos TM y una topología N-t/C-t citosólicos (Brill et al, 2000; Fujiki et al, 2006). Para otras MP de la superfamilia 30k, la información que se tiene es mucho menor, así por ejemplo la MP del AMV se ha visto, por medio de fusiones a GFP, que co-localiza con marcadores de membrana del retículo (Huang, 1999). La asociación de la MP del virus del mosaico del malvavisco (*Abutilon mosaic virus*, AbMV) a membranas ha sido demostrada recientemente en levaduras empleando el sistema de doble híbrido (Frischmuth et al, 2004). El presente capítulo pretende profundizar en la capacidad de la MP del PNRSV para asociarse a las membranas así como identificar el o los dominios implicados en esta interacción y su requerimiento en el movimiento célula-célula del virus.

#### r.3.1 Análisis de la secuencia de la MP del PNRSV

La mayoría de programas empleados para la detección de fragmentos TM (apartado ex.1.1) identificaron en la secuencia de p32 (código de acceso CAG27304 en la base de datos del NCBI) una región lo suficientemente hidrofóbica (HR) como para insertarse en la bicapa, localizada entre los aminoácidos 90 y 110 aproximadamente. Los resultados para cada uno de estos algoritmos aparecen resumidos en la tabla 3.1.

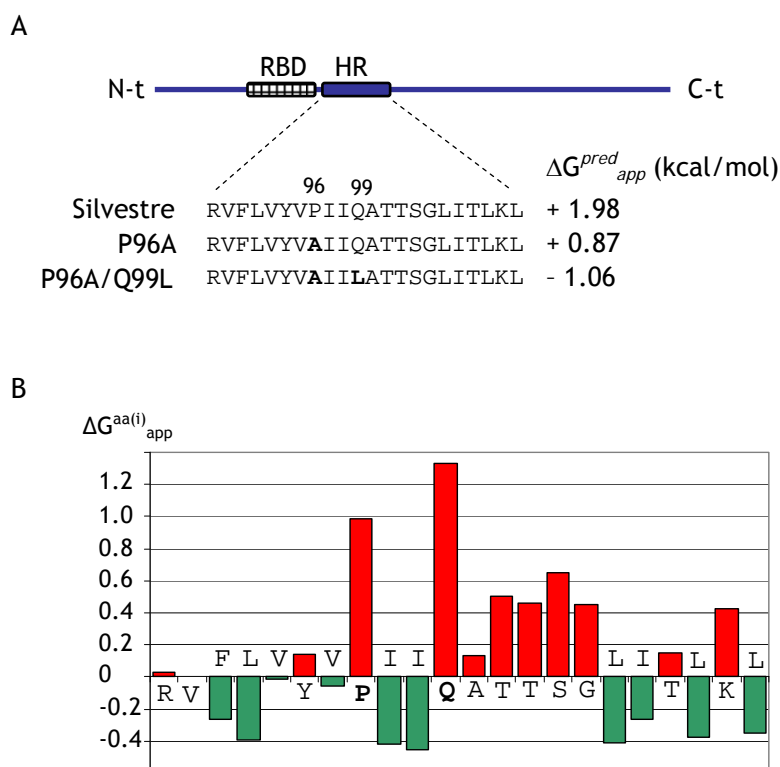


Tabla 3.1. Resultado del análisis *in silico* de la secuencia de p32.

PROGRAMA	fsTM (aa inicio - aa fin)
DAS	1 (95 - 109)
HMMTOP	1 (90 - 109)
MEMSAT	1 (90 - 108)
SOSUI	0
SPLIT	1 (92 - 113)
TMpred	1 (90 - 113)
TopPRED	1 (90 - 110)
TMHMM	0

En la columna de la izquierda se muestran los programas empleados, en la de la derecha el número de fragmentos transmembrana (fsTM) detectados y los aminoácidos (aa) que los constituyen entre paréntesis.

Empleando  *$\Delta G$  Prediction server* (<http://www.cbr.su.se/DGpred>) se realizó un análisis exhaustivo de la secuencia comprendida entre los aminoácidos 89 y 110. Este programa permite estimar la diferencia de energía libre aparente ( $\Delta G_{app}$ ) para la inserción de cortas secuencias polipeptídicas en la membrana (Hessa et al, 2005; Hessa et al, 2007). El valor positivo de  $\Delta G_{app}$  obtenido indica que la región a estudio no sería un dominio realmente TM (figura r.3.1 A). El programa muestra además la predicción del valor de  $\Delta G_{app}$  para cada aminoácido perteneciente a esta región hidrofóbica, como puede verse (figura r.3.1 B) fundamentalmente son la Pro 96 y la Gln 99 los residuos que dificultan la inserción de este segmento en la bicapa. Es interesante destacar que la sustitución de la Pro 96 por Ala reduce el valor de  $\Delta G_{app}$  predicho para la HR en más de 1 kcal/mol, mientras que el mutante donde se sustituye la Pro 96 por Ala y la Gln 99 por Leu alcanza un valor negativo de  $\Delta G_{app}$ , lo que correspondería a una región con tendencia a insertarse de forma transmembranal (figura r.3.1 A).



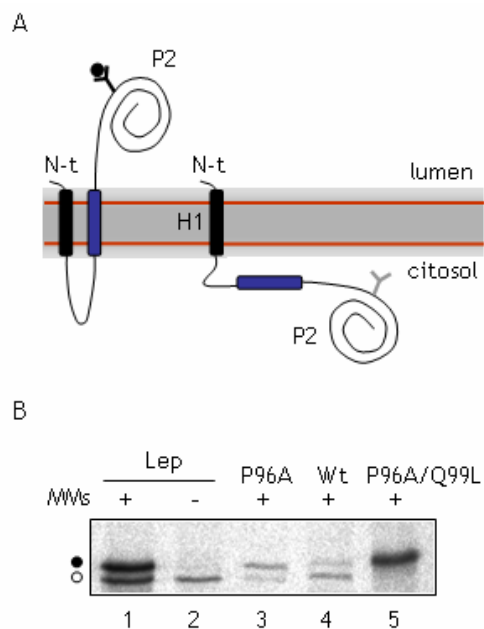
**Figura r.3.1. Análisis de la región hidrofóbica de p32.** **A.** Esquema de la secuencia de p32 donde se muestra la localización de la región hidrofóbica (HR) y del dominio de unión de RNA (RBD). Abajo. Valores de  $\Delta G_{app}$  predichos por el programa  $\Delta G$  prediction server para la secuencia silvestre de la HR y los mutantes Pro96Ala (P96A) y Pro96Ala Gln99Leu (P96A/Q99L). Un valor negativo de  $\Delta G_{app}^{pred}$  indica inserción y un valor positivo no inserción, cuanto más elevados son estos incrementos (en valor absoluto) mayor es la tendencia de la secuencia analizada a insertarse o a ser translocada respectivamente. **B.** Valor de  $\Delta G_{app}$  por residuo predicho por el programa  $\Delta G$  prediction server. Se puede ver que son la Pro y la Gln los residuos que mayores restricciones imponen a la inserción de la región en la membrana.

### r.3.2 Inserción de la región hidrofóbica de p32 en el contexto de una proteína modelo

Para analizar experimentalmente la capacidad para insertarse en membranas de esta HR se empleó la técnica de mapeo por glicosilación basada en la proteína de membrana Lep (apartado ex.1.2). Lep presenta dos regiones TM

Asociación a membranas de p32 del PNRSV

(H1 y H2) separadas por un lazo citosólico (P1) un dominio luminal (P2) en el que se ha introducido una diana de glicosilación (figura r.3.2 A), la cual será modificada cuando la proteína sea traducida en presencia de membranas (figura r.3.2 B carreras 1 y 2).



**Figura r.3.2. Mapeo por glicosilación de la región hidrofóbica (HR) de p32.** A. Esquema de las posibles topologías que puede adoptar Lep según la secuencia que sustituye a H2 se inserte en las membranas (derecha) o no (izquierda). B. Resultado de la autorradiografía tras la transcripción, traducción y separación electroforética de las quimeras de Lep en presencia (+) o ausencia (-) de microsomas como fuente de membranas. La glicosilación se indica con un círculo negro, la no glicosilación con uno blanco.

En base a las predicciones realizadas por  $\Delta G$  prediction server el H2 de Lep fue sustituido por la HR (residuos 89- 109) de p32. El dominio P2 en este caso sólo será glicosilado, tras la transcripción y traducción *in vitro* en presencia de microsomas, si la HR de p32 es capaz de insertarse en la membrana. El porcentaje de glicosilación de Lep bajó de aproximadamente un 75% para la proteína modelo a un escaso 20% cuando HR de p32 sustituía

al H2 de Lep (figura r.3.2 B carrera 4), indicativo de la poca capacidad de esta secuencia para insertarse en membranas microsomaes incluso cuando utiliza a la proteína Lep como vehículo de direccionamiento a membranas.

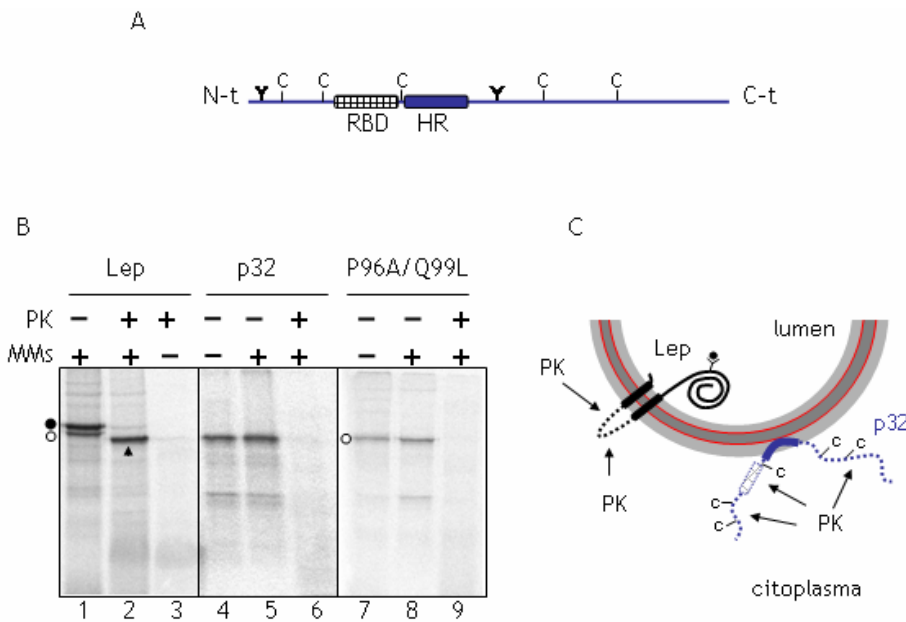
Sin embargo, la sustitución de la Pro 96 por Ala incrementó el grado de glicosilación a un 80% (carrera 3). Es más, el doble mutante P96A/Q99L provoca unos valores de glicosilación mayores incluso que los de la secuencia silvestre de Lep (>95%, carrera 5). Este comportamiento demuestra que la HR de p32 se inserta con poca eficiencia en membranas biológicas y que son la Pro 96 y la Q99 los principales impedimentos para la integración en la bicapa de esta secuencia, al menos en el contexto de Lep; resultado que coincide con las predicciones realizadas con  $\Delta G$  prediction server.

### **r.3.3 La proteína de movimiento del PNRSV no es una proteína integral de membrana**

Una vez demostrado que la HR de p32 no se inserta eficientemente en membranas microsomaes cuando emplea Lep como vehículo de direccionamiento e inserción, se planteó el estudio de la capacidad de integración en membranas de la secuencia completa de p32. Para visualizar la translocación al lumen de los microsomas de los extremos N-t y/o C-t, se insertó una diana de glicosilación en cada uno de los lados de la HR (figura r.3.3 A). La translocación de cualquiera de los dos extremos provocará la glicosilación de la proteína, con el consiguiente retraso electroforético en geles de SDS-PAGE. La exportación de la proteína completa al lumen de los microsomas generaría una versión de la proteína doblemente glicosilada. La adición de PK a la proteína traducida en presencia de microsomas provocará la digestión de aquellas regiones de la proteína expuestas al citoplasma mientras que las insertadas en la membrana y las translocadas al interior de los microsomas quedaran protegidas frente a la digestión (apartado ex.3.2).

La traducción *in vitro* de la proteína en presencia de microsomas produjo una proteína no glicosilada (figura r.3.3 B carreras 4 y 5) sensible a la digestión con PK (carrera 6). Como control de glicosilación y digestión con PK se empleó Lep, cuya traducción con membranas provoca la aparición de una banda de mayor tamaño molecular en geles de acrilamida (carrera 1) procedente de la glicosilación de la diana de P2. La digestión con PK de Lep no es completa debido a la protección que ofrecen los microsomas al H2 y al

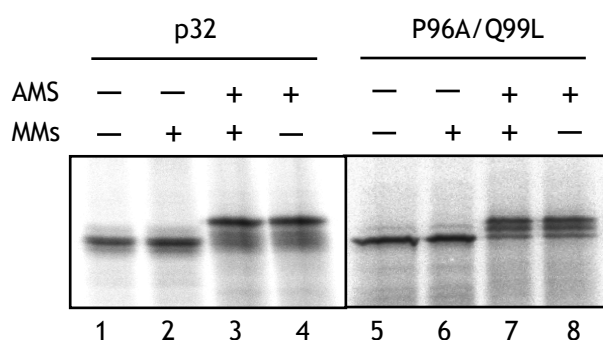
dominio P2 de la proteína (figura r.3.3 B carrera 2) (Mingarro et al, 2000). Es interesante destacar que el doble mutante de p32 (P96A/Q99L) tampoco fue glicosilado además de ser completamente digerido tras el tratamiento con PK (figura r.3.3 B carreras 7, 8 y 9) lo que implica que ni siquiera este mutante dispone su HR como un dominio realmente TM.



**Figura r.3.3. Inserción de p32 en membranas.** A. Esquema de la secuencia de p32 donde se señalan los sitios de glicosilación añadidos (Y), las Cys (C), la región hidrofóbica (HR) y el dominio de unión de RNA (RBD). B. Ensayo de traducción *in vitro* en presencia (+) o ausencia (-) de membranas y PK. La banda glicosilada de Lep (carrera 1) se indica con un círculo negro mientras que la fracción de proteína no glicosilada con un círculo blanco. Una punta de flecha señala la banda de protección generada tras el tratamiento con PK. C. Representación de la disposición de Lep y p32 en la membrana de los microsomas. En línea discontinua se muestran los dominios que son accesibles a la digestión con PK.

Para corroborar los resultados de glicosilación y digestión con PK se estudió la disposición de la proteína en membranas mediante marcaje específico de Cys con el reactivo impermeable a las membranas biológicas 4-acetamida-4'-madeimidilestilbeno-2,2'-ácido disulfónico (AMS) (apartado

ex.3.3). El AMS es capaz de marcar la MP del PNRSV tras ser traducida *in vitro* tanto en ausencia como en presencia de microsomas. La movilidad electroforética observada en ambos casos corresponde con la modificación de las cinco Cys de p32 (figura r.3.4 carreras 1-4), lo que sugiere que la proteína adopta una disposición junto a las membranas en la que todas las Cys son accesibles, de modo que ninguno de los extremos de la proteína está siendo translocado al lumen del retículo (figura r.3.3 C). El mismo patrón fue observado cuando se sometió a la versión de p32 que presenta la Pro 96 sustituida por Ala y la Gln 99 por Leu al tratamiento con AMS (figura r.3.4 carreras 5-8). Resultados que coinciden con los obtenidos en los ensayos de glicosilación y digestión con PK.



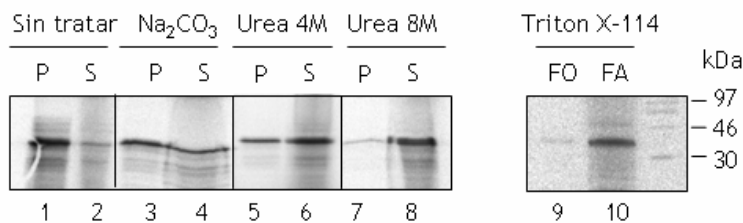
**Figura r.3.4. Marcaje específico de cisteínas con AMS.** El ácido disulfónico 4-acetamido-4'-madeimidilestilbeno-2,2' (AMS) se une específicamente al grupo sulfhidrilo de las Cys que se encuentran en el lado citosólico de los microsomas. Tanto la secuencia silvestre de p32 (carreras 1-4) como el doble mutante (P96A/Q99L) (carreras 5-8) presentan un retraso electroforético similar tras la adición de AMS en presencia (+) y en ausencia (-) de microsomas lo que indica que ninguna Cys se encuentra protegida por los microsomas.

### r.3.4 p32 se asocia a las membranas de forma periférica

La MP del PNRSV traducida *in vitro* en presencia de membranas microsomales y metionina marcada con  $^{35}\text{S}$  es recuperada en el sedimento membranoso tras una ultracentrifugación a 100.000g. Lo que indica que la proteína se encuentra asociada a las membranas (de manera periférica o integral) o translocada al lumen de los microsomas. Para diferenciar entre

### Asociación a membranas de p32 del PNRSV

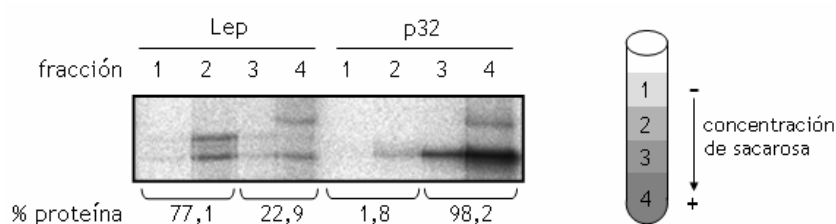
estas posibilidades la mezcla de traducción fue tratada con carbonato sódico pH 11.5 (apartado ex.2.1) (Navarro et al, 2006; Peremyslov et al, 2004b) antes de la ultracentrifugación. Como puede verse en la [figura r.3.5](#), p32 aparece fundamentalmente en el precipitado (carreras 3 y 4) lo que sugiere que la MP está asociada a los microsomas descartando la posibilidad de que estuviese siendo translocada al lumen de los microsomas. El tratamiento con urea 4 y 8 M solubiliza el 68% y 95% de la proteína respectivamente ([figura r.3.5](#) carreras 5-6 y 7-8), confirmando que p32 no es una proteína integral de membrana, dado que ésta es solubilizada en presencia del agente desnaturizante.



**Figura r.3.5. p32 se asocia de manera periférica a las membranas microsomales.** Izquierda, sedimentación (P) y sobrenadante (S) tras la ultracentrifugación de la mezcla de traducción de p32 (carreras 1 y 2). Tras la traducción las muestras fueron tratadas con carbonato sódico (carreras 3 y 4), urea 4M (carreras 5 y 6) ó urea 8M (carreras 7 y 8) y a continuación sometidas a ultracentrifugación. Derecha, reparto de fases en presencia de Triton X-114, FO fase orgánica (carrera 9), FA fase acuosa (carrera 10).

La mezcla de traducción fue tratada también con Triton X-114 (apartado ex.2.2), detergente capaz de formar dos fases en función de la temperatura, una orgánica donde residen las proteínas integrales de membrana y otra acuosa con el resto de proteínas (aquellas solubles y asociadas de manera periférica a la membrana) (Bordier, 1981). Como puede observarse p32 se detectó en la fase acuosa ([figura r.3.5](#), carreras 9 y 10) reforzando la idea de una asociación periférica a membranas.

Finalmente, se decidió analizar la interacción con membranas de la MP del PNRSV realizando experimentos de flotación de membranas en gradiente de sacarosa (apartado ex.2.3). Como muestra la [figura r.3.6](#) cuando p32 fue traducida *in vitro* en presencia de membranas y sometida a centrifugación en gradiente, la mayoría de la proteína (>98%) fue recuperada en las fracciones inferiores (fracciones 3 y 4) indicando que p32 no es una proteína integral de membrana. En paralelo se realizó el mismo experimento empleando Lep (proteína integral de membrana) a modo de control. Como se puede ver ([figura r.3.6](#), carreras 1-4) Lep al contrario que p32 se encontró en las fracciones superiores (1 y 2), en las cuales se acumulan las membranas.



**Figura r.3.6. Flotación alcalina de membranas.** Experimento realizado en con Lep, como control de una proteína integral de membrana, y p32. Tras la centrifugación de la mezcla de traducción (4 horas a 55000 rpm y 4°C) las fracciones superiores (1 y 2) corresponden a la fracción donde se localizan las proteínas integrales de membrana. En las fracciones inferiores (3 y 4) se acumulan proteínas periféricas de membrana y el resto de proteínas solubles. El cálculo del porcentaje de proteína en cada una de las fracciones se realizó empleando el programa de análisis de imagen *Image Gauge v4.0*.

Los resultados previos sugieren que la MP del PNRSV se asocia a membranas pero su HR, a pesar de ser probablemente la responsable de la asociación a la bicapa no es una región TM. Péptidos correspondientes a los dominios que interactúan con membranas de varias glicoproteínas virales (péptidos de fusión), han sido empleados como modelos de estudio para la caracterización funcional y estructural de estas regiones (White et al, 2008). Aunque existen diferencias particulares entre cada uno de estos péptidos de fusión la mayoría de ellos comparten como característica común la presencia de una prolina en la parte central de la secuencia hidrofóbica (Delos et al, 2000; Gomara et al, 2004; Ito et al, 1999), que induce que estas regiones se

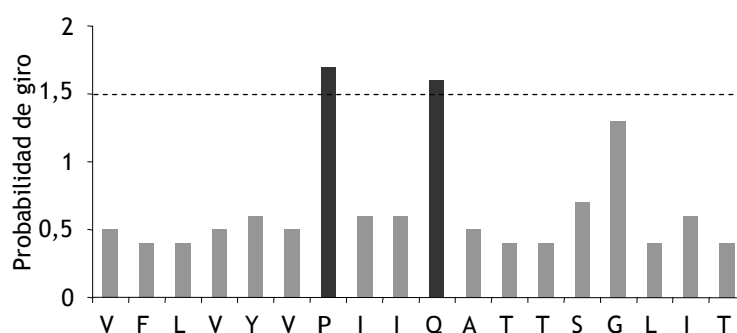


dispongan en la membrana con una estructura acodada. Como puede observarse en su secuencia la HR de p32 también presenta una prolina en el centro ([figura r.3.1 A](#)) que junto a la glutamina 99 evitan probablemente la inserción de esta región en las membranas de la planta. A continuación se estudió la estructura y la interacción con membranas de la HR de p32 silvestre y p32 P96A/Q99L empleando péptidos sintéticos como análogos estructurales.

### **r.3.5 Determinación del efecto de los cambios Pro96Ala y Gln99Leu en la estructura secundaria de la HR de p32**

La MP del PNRSV no es capaz de insertarse en membranas de manera co-traducciona, esto implica que la proteína es traducida en el citosol antes de su asociación a la membrana. La energía libre asociada a la transferencia desde el agua a la interfase de la membrana de la HR de p32 plegada como hélice alfa ( $\Delta G_{wif} = -11.5$  kcal/mol) (apartado i.7.1) es claramente menor que el valor de  $\Delta G$  para la transferencia a la interfase de la misma secuencia desplegada ( $\Delta G_{wif} = -0.98$  kcal/mol) o que la energía libre de insertar esa secuencia como una alfa hélice TM en el núcleo hidrofóbico de la membrana ( $\Delta G_{woct} = -3.8$  kcal/mol) (Ladokhin & White, 1999; Wimley & White, 1996). Estas predicciones de los valores de  $\Delta G$  fueron obtenidas con el programa MPEx (Jaysinghe S et al, 2006). Estos cálculos implican que desde un punto de vista energético la HR de p32 prefiere permanecer asociada a la interfase de la membrana adoptando una estructura en hélice alfa cuando es transferida desde el agua a la membrana.

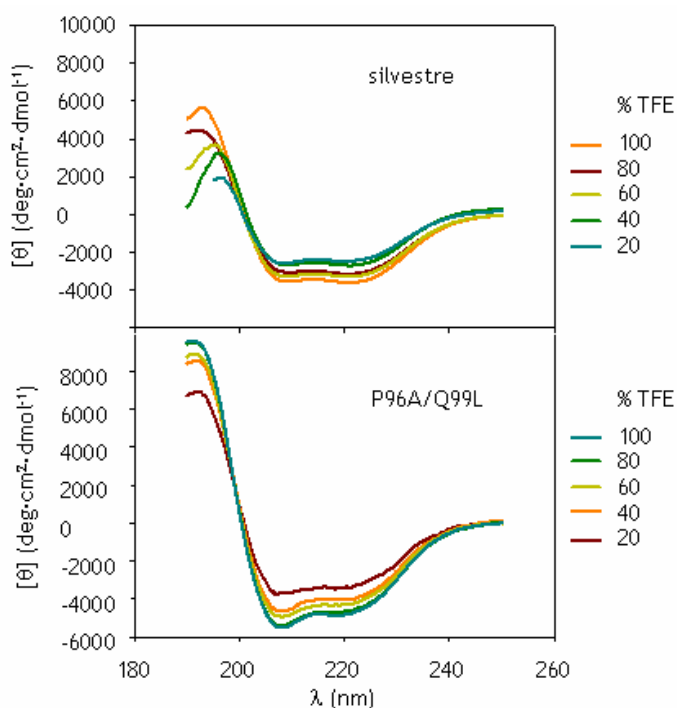
El análisis de la secuencia de la HR de p32 indica que ésta podría adoptar una estructura en hélice alfa con un giro en la región central. En la [figura r.3.7](#) se muestra la tendencia a formar giros de los aminoácidos de la secuencia de la HR (Monne et al, 1999). Como puede observarse la Pro 96 y la Gln 99, localizadas en la zona central de la secuencia, presentan una elevada tendencia a formar giros, ambos aminoácidos serían los responsables de la posible adopción de una estructura acodada dentro de la HR una vez ésta se dispone en la interfase de la membrana.



**Figura r.3.7. Tendencia a formar giros de la secuencia de la HR de p32.** Probabilidad de giro de cada aminoácido dentro de la región hidrofóbica de p32. Valores obtenidos de (Monne et al, 1999).

### r.3.6 Dicroísmo circular

Para estudiar el efecto de la Pro y la Gln en la estructura de la HR se diseñaron y sintetizaron dos péptidos mediante química *Fmoc*, uno correspondiente a los residuos 89-109 de la secuencia silvestre de p32 y otro con las sustituciones Pro 96 por Ala y Gln 99 por Leu (apartado M.7). La estructura secundaria de ambos péptidos fue analizada mediante dicroísmo circular (CD) en el ultravioleta lejano (apartado Ex.4). Los espectros fueron medidos en mezclas agua:trifluoroetanol 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100 (figura r.3.8). Ambos péptidos presentan unos espectros característicos de una estructura fundamentalmente helicoidal, con un máximo entorno a 190 nm y dos mínimos a 208 y 222 nm respectivamente. Los valores más elevados en el doble mutante P96A/Q99L así como la presencia de un mínimo a 208 nm más marcado (figura r.3.8) sugieren un mayor porcentaje de estructura helicoidal en este péptido que en el basado en la secuencia silvestre.

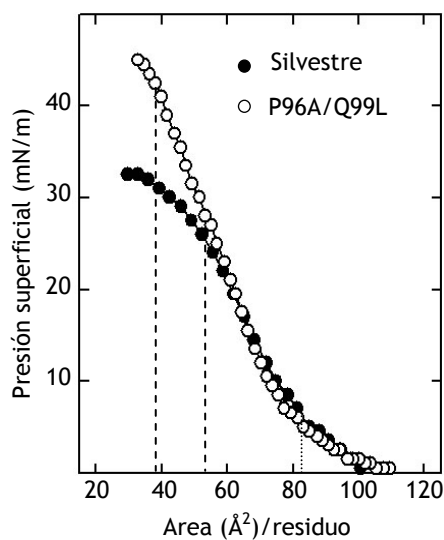


**Figura r.3.8. Espectros de CD de péptidos hidrofóbicos.** CD en el ultravioleta lejano de los péptidos de la HR de p32 (correspondientes a la secuencia silvestre y al doble mutante) en solución acuosa con diferentes porcentajes de TFE. Se puede observar el máximo entorno a 190 nm y los mínimos a 208 nm y 222 nm característicos de estructuras helicoidales.

### r.3.7 Disposición en interfases aire/agua

Las isothermas área/presión ( $\pi$ -A) de monocapas peptídicas pueden ser empleadas para obtener información sobre la conformación de los péptidos en interfases aire-agua (Perez-Gil et al, 1992; Plasencia et al, 2001; Serrano et al, 2007) (apartado ex.5.2). La [figura r.3.9](#) muestra las isothermas  $\pi$ -A de los péptidos correspondientes a la HR de p32 (silvestre y P96A/Q99L), cuando son depositados en la interfase aire/agua. Ambas moléculas tienen un área molecular máxima ( $A_{\max}$ ) de aproximadamente 85 Å<sup>2</sup>/residuo, cuando la monocapa se encuentra poco comprimida, es decir, cuando la presión superficial ( $\pi$ ) es baja, valores de área por residuo que corresponden con una disposición bastante extendida de las secuencias. Sin embargo ambos péptidos presentan un área molecular mínima ( $A_{\min}$ ), obtenida a presión

máxima antes del colapso, muy diferente. Mientras que el doble mutante (P96A/Q99L) puede ser comprimido hasta  $\sim 40 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$ , el péptido correspondiente a la secuencia silvestre alcanza  $A_{\text{min}}$  de  $\sim 55 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$ . Esto indica que la secuencia silvestre ocupa, una vez ha sido comprimida al máximo, bastante más espacio en la interfase que la secuencia sin la Pro y la Gln, probablemente debido al giro en la hélice que promueven estos dos aminoácidos. Las monocapas formadas por el péptido mutante pueden ser comprimidas hasta alcanzar presiones más elevadas ( $\pi_{\text{max}} \sim 45 \text{ mN/m}$ ) que las formadas por la secuencia silvestre ( $\pi_{\text{max}} \sim 32 \text{ mN/m}$ ), lo que refleja una mayor estabilidad del péptido P96A/Q99L en monocapas interfaciales, como era de esperar dada su menor  $\Delta G_{\text{app}}$ .



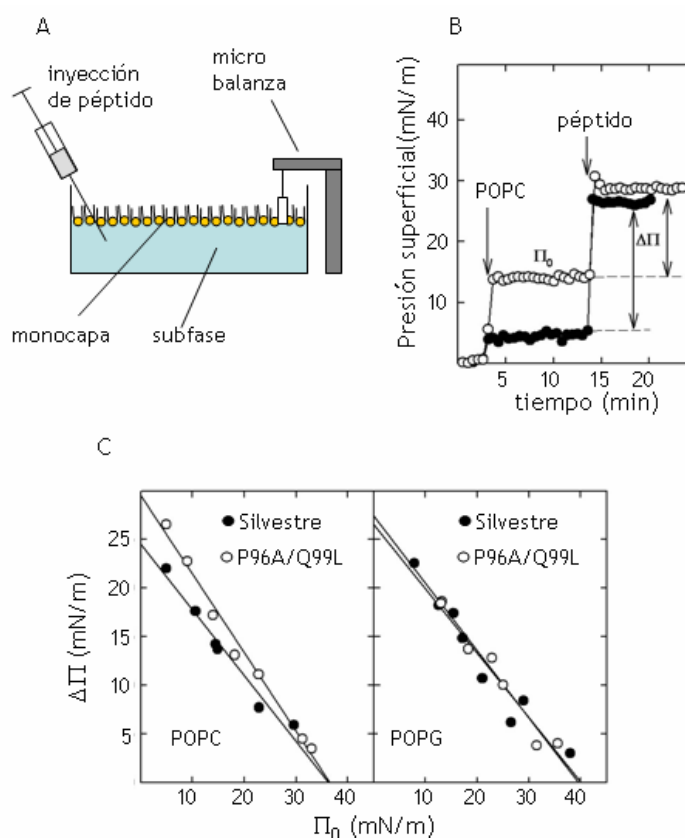
**Figura r.3.9. Monocapas interfaciales de péptido.** Isotermas de área/presión de monocapas formadas por los péptidos correspondientes a la secuencia de la HR de p32 (silvestre y P96A/Q99L, círculo negro y blanco respectivamente).  $A_{\text{max}}$  y  $A_{\text{min}}$  se obtienen de proyectar sobre el eje de abscisas los puntos donde la isoterma gana (línea de puntos) y pierde (línea discontinua) respectivamente la linealidad.

### **Inserción de péptidos hidrofóbicos en monocapas de fosfolípidos**

Para analizar las diferencias intrínsecas en la habilidad de los péptidos, silvestre y mutante (P96A/Q99L), para insertarse en interfases de fosfolípidos se empleó la técnica de monocapas (apartado ex.5.3) (figura r.3.10 A). La asociación o inserción de un péptido en una monocapa de POPC, pre-formada a una determinada presión, es detectada por el aumento que se produce en la presión superficial tras la inyección del péptido en la subfase (figura r.3.10 B).

La capacidad para insertarse en membranas de los dos péptidos sintetizados fue estudiada en monocapas lipídicas puras de lípidos zwitteriónicos (palmitoil oleoil fosfatidil colina, POPC) y aniónicos (palmitoil-oleoil-fosfatidil glicerol, POPG). Ambos péptidos presentan presiones críticas de inserción ( $\pi_c$ ) mayores de 30 mN/m tanto en monocapas zwitteriónicas como en monocapas aniónicas, lo que confirma la habilidad de ambos para asociarse a membranas de fosfolípidos (figura r.3.10 C).

En monocapas de POPC las rectas de  $\Delta\pi/\pi_0$  presentan pendientes diferentes para cada uno de los péptidos, lo cual puede ser consecuencia de una diferencia en la orientación que adoptan los péptidos al insertarse en la monocapa (Serrano et al, 2006). Este resultado confirmaría que el péptido silvestre y el mutante se asocian a los lípidos a través de una conformación diferente. Cuando se emplearon monocapas de POPG no se observan diferencias significativas ni en la  $\pi_c$  ni en la pendiente de la gráfica  $\Delta\pi/\pi_0$ . Las cargas negativas del lípido probablemente estén anclando los dos extremos (N-t y C-t) cargados positivamente de ambos péptidos a la superficie de la monocapa eliminándose con esto el efecto de la estructura.



**Figura r.3.10. Monitorización de la interacción entre la HR de p32 y monocapas de lípidos. A.** Representación esquemática de la técnica de monocapas empleada para cuantificar la capacidad de los péptidos derivados de la secuencia de p32 para insertarse en monocapas lipídicas. **B.** Depositando cantidades crecientes de lípido en la interfase aire/agua se pueden formar monocapas a diferentes presiones iniciales (3 mN/m círculos negros o 13 mN/m círculos blancos). La capacidad para interactuar con las membranas de un péptido se calcula a partir de la variación de presión superficial ( $\Delta\pi$ ) producida tras inyectar el péptido en la subfase de una monocapa lipídica. **C.** Determinación de la presión crítica de inserción para los péptidos derivados de la HR de p32, con círculos negros se muestran los  $\Delta\pi$  obtenidos con el péptido que representa la secuencia silvestre y con círculos blancos los correspondientes al doble mutante (P96A/Q99L).

### Monocapas péptido/lípido

Para analizar la estabilidad relativa de las secuencias silvestre y mutante una vez insertadas en monocapas de fosfolípidos se obtuvieron las isothermas  $\pi$ -A de dipalmitoil-fosfatidil colina (DPPC) en ausencia o en presencia de 0.75, 1.5 o 2.3% de cada uno de los péptidos. La compresión de monocapas formadas exclusivamente por DPPC produce isothermas bien definidas, con un hombro de condensación entorno a 9 mN/m y una elevada presión de colapso (entorno a 70mN/m), que permiten una clara evaluación del efecto de las interacciones lípido-proteína (figura r.3.11). La incorporación de ambos péptidos produce una progresiva expansión (hacia áreas mayores) de la isoterma de DPPC, como resultado del área ocupada por el péptido en la monocapa. La expansión de la monocapa en ambos casos es dependiente de la concentración de péptido. Las monocapas con el péptido silvestre presentan un hombro de exclusión entorno a 47-48 mN/m, mientras que el péptido mutante permanece en la monocapa hasta presiones más elevadas. Efecto que de nuevo indica que la secuencia silvestre (con la Pro y la Gln) es menos estable en las monocapas, probablemente debido a su menor hidrofobicidad y a su estructura de hélice alfa acodada.

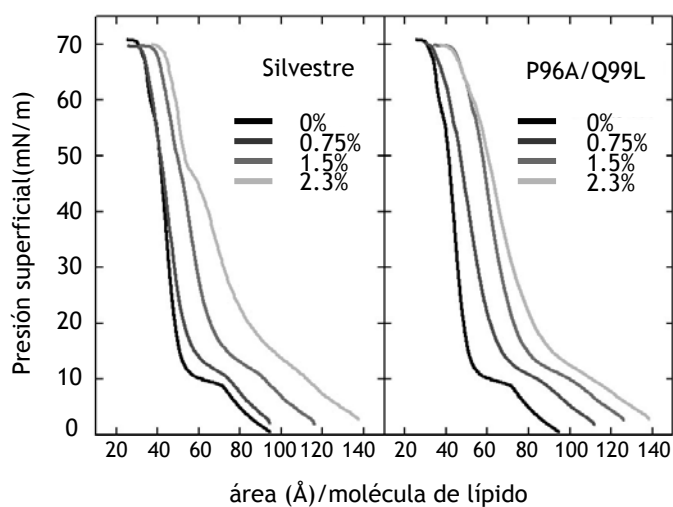
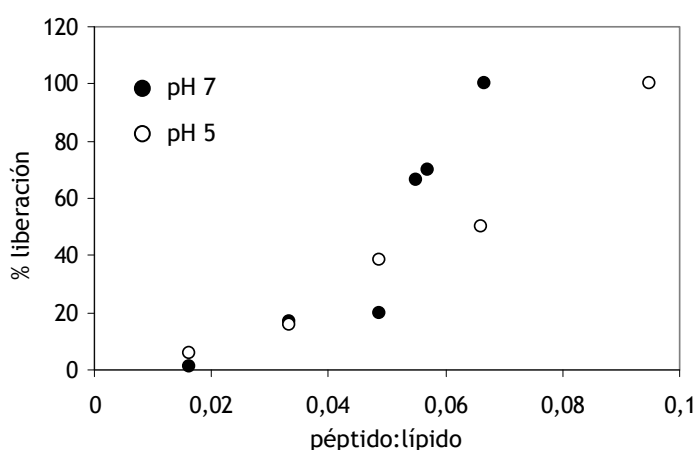


Figura r.3.11. Estabilidad de péptidos hidrofóbicos en monocapas. Isothermas de área/presión de monocapas de DPPC en ausencia y presencia de péptido (0.75, 1.25, o 2.3% p/p).

### r.3.8 Liberación de contenidos

Las secuencias de las regiones de interacción con membrana de muchas glicoproteínas virales (péptidos de fusión) han sido extensivamente caracterizadas (White et al, 2008). Muchos de estos dominios hidrofóbicos presentan características similares a la HR de p32, siendo, como ya se vio anteriormente, la presencia de una prolina crítica en el centro de la secuencia una de ellas (Delos et al, 2000; Gomara et al, 2004; Ito et al, 1999). Esta prolina provoca un giro en un fragmento helicoidal análogo al que se podría estar produciendo en p32. En numerosos casos estos péptidos de fusión son capaces de perturbar las membranas y liberar el contenido de vesículas lipídicas. La HR de PNRSV dada su similitud con estas secuencias y su habilidad para asociarse a membranas podría a su vez ser capaz de permeabilizar membranas.



**Figura r.3.12. Liberación de contenidos.** El péptido correspondiente a la secuencia hidrofóbica de p32 es capaz de permeabilizar liposomas formados por POPC/POPG (60%/40%) tanto a pH 5 como a pH 7.

El péptido correspondiente a la secuencia silvestre de la HR de p32 se añadió a liposomas de POPC y POPC/POPG (60/40), que contenían la pareja fluoróforo-extintor ANTS-DPX, para conocer su capacidad para



liberar contenidos (apartado Ex.6). La adición del péptido sobre liposomas formados exclusivamente por POPC no produjo liberación alguna a ninguno de los pH ensayados. Mientras que cuando los liposomas contenían además de POPC un 40% de POPG, el péptido si fue capaz de permeabilizar las membranas, tanto a pH 5 como a pH 7 (figura r.3.12). El porcentaje de liberación en ambos casos es dependiente de la concentración de péptido. Este efecto, si bien no puede ser relacionado directamente con la función *in vivo* de la MP, demuestra inequívocamente la interacción entre el péptido y las bicapas lipídicas de los liposomas.

### **r.3.9 Requerimiento de la HR en el movimiento célula-célula de PNRSV**

Para conocer el requerimiento de la región hidrofóbica de p32 en el movimiento intra- e intercelular del PNRSV se empleó la técnica descrita en el apartado Ex.7. Al RNA 3 del AMV se le añadió en su extremo 5' la secuencia de la GFP y la región codificante para la MP del AMV fue sustituida (respetando los 44 aminoácidos del extremo C-t) por la de la MP del PNRSV. Este RNA transgénico puede ser traducido en plantas de tabaco P12. Cuando la MP sea capaz de llevar a cabo su función el RNA viral será transportado de una célula a otra, fenómeno que podrá ser detectado por la fluorescencia emitida por la GFP (Herranz et al, 2005b; Sanchez-Navarro et al, 1997).

Cuando el RNA conteniendo la secuencia completa de la MP fue inoculado en hojas P12 se observaron células individuales fluorescentes dos días después de la inoculación (2 dpi) que se transformaron en focos de infección, con múltiples células expresando la GFP, a los cuatro días de la de la inoculación (4 dpi). Resultados que demuestran que la quimera es activa y que permite el estudio de la actividad de p32 (figura r.3.13).

La eliminación de la región hidrofóbica, aminoácidos 89-109 ( $\Delta$ HR), produjo células fluorescentes a los 2 dpi, pero esta infección no pudo extenderse y formar focos de infección a los 4 dpi. Cabe mencionar que la construcción fue expresada en protoplastos con los mismos niveles que la quimera con la secuencia silvestre de p32, lo que confirma la correcta expresión de la proteína aunque ésta no sea funcional para el transporte del RNA viral. Resultados similares se produjeron cuando la prolina 96 fue sustituida por alanina, tanto en el caso del mutante simple (P96A) como en

el del doble mutante (P96A/Q99L). Cabe destacar que cuando la Gln 99 fue sustituida por leucina en presencia de la Pro96 (Q99L), la MP mantuvo su capacidad para transportar RNA. La presencia de la Pro 96 en la HR es por tanto indispensable para el movimiento célula-célula del PNRSV al igual que el conjunto de la HR, no así la Glu 99.

Se ha sugerido que la regulación de la localización de las MP de la superfamilia 30k estaría controlada por fosforilación (Lee & Lucas, 2001; Waigmann et al, 2000). Dado que la HR presenta dos Thr en su secuencia se decidió eliminarlas para conocer su relevancia en el movimiento célula-célula. La sustitución de las Thr 101 y 102 por Ala no impidió la expansión de la infección por lo que su fosforilación, de producirse, no debe desempeñar un papel relevante en el movimiento del virus.

		Hojas		
		2 dpi	4 dpi	Protoplastos
<p>PNRSV MP</p> <p>GFP HR AMV CP</p> <p>GRVFLLVYVP I I QATT SGLITLKL</p>				
Silvestre	GRVFLLVYVP I I QATT SGLITLKL	+	+	+
ΔHR	GRVFLLVYVP I I QATT SGLITLKL	+	—	+
P96A	GRVFLLVYV A I I QATT SGLITLKL	+	—	+
Q99L	GRVFLLVYVP I I LATT SGLITLKL	+	+	+
P96A/Q99L	GRVFLLVYV A I I LATT SGLITLKL	+	—	+
T101,102A	GRVFLLVYV A I I L A A SGLITLKL	+	+	+

**Figura r.3.13. Movimiento célula-célula del RNA viral.** Detección en hojas (2 dpi y 4 dpi) y en protoplastos de plantas P12 de los RNA virales mediante microscopía confocal, la barra representa 200 μm (hojas) o 20 μm (protoplastos). Las modificaciones sobre la secuencia silvestre de la HR de la MP del PNRSV se indican a la derecha. Sobre la secuencia hidrofóbica se indica en cursiva los aminoácidos flanqueantes, en gris los aminoácidos eliminados y en negrita las sustituciones. En la parte superior se muestra un esquema del RNA empleado en el ensayo que contiene la GFP (verde), la MP del PNRSV (gris) fusionada a los 44 aminoácidos de la MP del AMV (naranja) y la CP del AMV (naranja); en gris oscuro se señala la HR de p32.

### **r.3.10 Discusión**

Para atravesar la barrera que supone la pared celular, los virus de plantas en su movimiento célula-célula aprovechan los plasmodesmos, los cuales conectan células adyacentes mediante derivaciones del ER. Las proteínas de movimiento, proteínas virales encargadas de transportar el RNA viral a través del plasmodesmo son capaces de interactuar con las membranas del ER (Brill et al, 2000; Peremyslov et al, 2004a; Vilar et al, 2002). En aquellos virus que presentan más de una proteína de movimiento, al menos una de ellas es una proteína integral de membrana, es el caso de los virus del género *Carmovirus* o de los pertenecientes al TGB. Dentro de la superfamilia 30k, a la cual pertenece el PNRSV, los estudios realizados se han centrado en la MP del TMV. Se ha postulado que esta proteína se insertaría en membranas a través de dos dominios TM, localizando ambos extremos N-t y C-t en el citosol. Para el resto de las MP de esta superfamilia viral, se asume una asociación a las membranas similar. Los análisis realizados con la secuencia de aminoácidos de la MP del PNRSV muestran que p32 contiene únicamente una región hidrofóbica, identificada por varios de los algoritmos empleados como un segmento TM. Con un solo dominio TM p32 sólo podría exponer uno de sus extremos (N-t o C-t) al citoplasma, a diferencia de lo propuesto para la MP del TMV.

Los experimentos de mapeo por glicosilación muestran que la HR de p32 no es capaz de adoptar una disposición transmembranal, ni siquiera en el contexto de la proteína de membrana Lep, y que los residuos que fundamentalmente están evitando esta inserción son la Pro 96 y la Gln 99. La proteína completa (tanto en su versión silvestre como tras la sustitución de la Pro 96 por Ala y la Gln 99 por Leu) es a su vez incapaz de insertarse en membranas microsomales como se demuestra en los experimentos de glicosilación, marcaje específico de Cys con AMS, digestión con PK y flotación de membranas. A pesar de que la HR P96A/Q99L es termodinámicamente estable en la bicapa, la secuencia no es capaz de integrarse en la membrana fuera del contexto de Lep. Esto es debido probablemente a que esta región no es reconocida por la SRP como una secuencia señal y por lo tanto la proteína no es integrada en la membrana de manera co-traduccional. p32, tras la sedimentación de membranas mediante ultracentrifugación, se encuentra sin embargo en el precipitado, incluso después de ser sometida a una extracción alcalina o a agentes desnaturizantes como urea 4 M, lo que indica su capacidad para asociarse

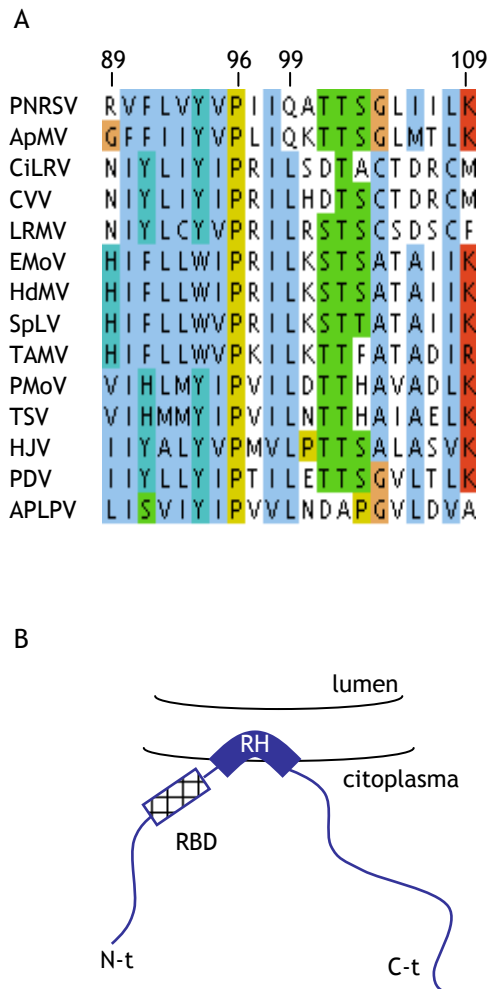
a las membranas. Interacción que probablemente este mediada por la HR. Sin embargo la proteína se encuentra en la fase soluble tras la desnaturalización con urea 8M y en la fase acuosa después del reparto de fases en presencia de Triton X-114, lo que sugiere de nuevo que p32 no es una proteína integral de membrana.

Los péptidos sintetizados muestran la capacidad de la HR (tanto de la silvestre como de la doble mutante) para interactuar con membranas, aunque probablemente cada uno con una conformación diferente. La Pro y la Gln definen la estructura de esta región así como las interacciones que se establecen con los lípidos. La HR de p32 adoptaría una estructura en alfa hélice con un codo en centro producido, fundamentalmente, por la presencia de estos dos residuos. El péptido con la secuencia silvestre probablemente se dispone paralelo a la bicapa, no como el doble mutante, el cual se encontraría perpendicular al plano de la membrana y paralelo a las colas hidrocarbonadas de los lípidos lo que le otorgaría junto a su menor área por molécula la mayor estabilidad observada en las monocapas.

La sustitución de la prolina central impide el transporte célula-célula del virus *in vivo*, lo que demuestra la importancia que tiene la estructura de la región hidrofóbica. En algunos virus animales ocurre un proceso similar, en éstos la sustitución de la Pro localizada en el dominio de interacción con membranas bloquea la capacidad infecciosa del virus y su habilidad para desestabilizar membranas (Gomara et al, 2004; Ito et al, 1999).

La capacidad para liberar el contenido de liposomas que muestra el péptido silvestre (también observada en los péptidos de fusión de las glicoproteínas de virus animales) es una prueba de la interacción directa del péptido derivado de la HR de p32 con las bicapas lipídicas. Esta habilidad para permeabilizar membranas podría ser un efecto asociado a la capacidad que presentan las MP de la superfamilia 30k *in vivo* para desorganizar la membranas de la planta (Reichel & Beachy, 1998).

Asociación a membranas de p32 del PNRSV



**Figura r.3.14. Papel de la HR en la asociación de p32 a la membrana del retículo. A.** Alineamiento de las secuencias de las MP de los *Ilarivirus* (según la base de datos VIDEL (<http://image.fs.uidaho.edu/vide/refs.htm>) (Brunt et al, 1996 onwards)) realizado empleando el servidor CLUSTAL W2 del EMBL ubicado en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> (Larkin et al, 2007), todos los parámetros se dejaron en sus valores por defecto. *American plum line pattern virus* APLPV, *Apple mosaic virus* ApMV, *Citrus variegation virus* CVV, *Citrus leaf rugose virus* CiLRV, *Hydrangea mosaic virus* HdMV, *Lilac ring mottle virus* LRMV, *Prune dwarf virus* PDV, *Elm mottle ilarivirus* EMoV, *Prunus necrotic ringspot virus* PNRSV, *Tobacco streak virus* TSV, *Spinach latent virus* SpLV, *Tulare apple mosaic virus* TAMV, *Parietaria mottle virus* PMoV, *Humulus japonicus virus* HJV. **B.** Modelo de interacción con membranas de la MP del PNRSV, en el que se muestra el dominio de unión a RNA (RBD, cuadrícula), la HR (negro) y los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína expuestos al citoplasma.

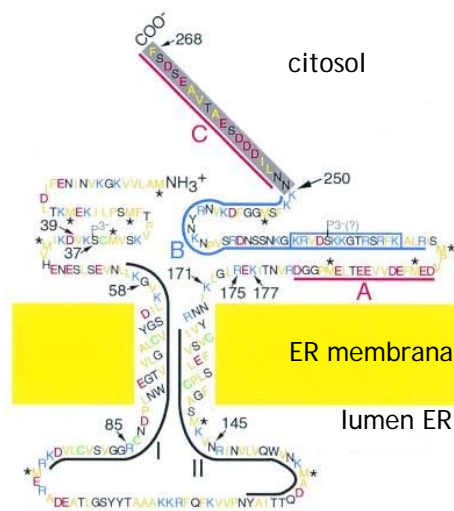
El alineamiento de las secuencias<sup>1</sup> de las HR de los virus del género *Ilarvirus* muestra a la Pro 96 como un residuo conservado en todos los virus (figura r.3.14 A), lo que confirmaría su importancia en la capacidad de la proteína para transportar el RNA viral a través de los plasmodesmos. Cabe destacar que la Gln 99 no se encuentra conservada en las secuencias de las MPs de este género estudiadas, lo que coincidiría con los resultados que muestran que no desempeñan un papel relevante en el movimiento célula-célula del genoma viral. Al igual que la Pro 96 la T102 está conservada en todos los *Ilarvirus*, excepto en el APLPV. La sustitución de la Thr 101 y la Thr 102 por Ala no afecta sin embargo, a la capacidad de la MP para promover el movimiento entre células adyacentes. Estos residuos (T101 y T102) a pesar de ser posiciones conservadas no parecen ser importantes ni en la regulación de la localización, ni en la disposición que la HR adopta en la membrana (figura r.3.14 B).

Los resultados en conjunto son consistentes con los datos que muestran una intensa interacción entre las MP de la superfamilia 30k y las membranas de la planta. p32 sería capaz de asociarse a membranas de manera periférica, a través de su único dominio hidrofóbico, cuya estructura, permitiría localizar ambos extremos en el citosol, permitiendo interacciones con el genoma viral y con los componentes necesarios de las células infectadas (figura r.3.14 B).

<sup>1</sup> Los números de acceso en la base de datos del NBCI para las secuencias empleadas en el alineamiento son: PNRSV CAG 27304, ApMV NP\_604484, CiLRV NP\_613279, CVV YP\_001285480, LRMV AAA64839, EMoP NP\_619577, HdMJV AAF89807, SpLV NP\_620680, TAMV NP\_620752, PMoV CAJ58677, TSV NP\_620773, HJV YP\_054424, PDV YP\_611152 y APLPV ABS19899.

#### R.4 ASOCIACIÓN A MEMBRANAS DE LA MP p30 DEL TMV

El virus del mosaico del tabaco (TMV) ha sido objeto de estudio desde los orígenes de la virología y es por tanto, un referente y modelo de trabajo tanto de la virología en general como de la virología de plantas en particular. Gran cantidad de los conocimientos que tenemos acerca de cómo los virus de plantas son capaces de atravesar la pared celular en su movimiento célula-célula provienen del estudio del TMV y de su MP. p30, como se conoce a la MP del TMV, es una proteína de 30 kDa (apartado i.5.4) con capacidad para unir RNA, interactuar con el citoesqueleto y aumentar el SEL de los plasmodesmos. Hasta la fecha se ha considerado a p30 de TMV como una proteína integral de membrana (Fujiki et al, 2006; Mas & Beachy, 1999), con dos fragmentos TM localizados aproximadamente entre los residuos 61-81 y 150-170 de su secuencia (Brill et al, 2000) (figura r.4.1).



**Figura r.4.1. Modelo topológico de TMV.** Modelo propuesto por Brill et al. (Brill et al, 2000) para la topología de TMV en la membrana del ER. Los aminoácidos hidrofóbicos se indican en amarillo, los básicos en azul, en rojo los ácidos y las Cys en verde. Según este modelo p30 presenta un extremo N-t citoplasmático de aproximadamente 60 aminoácidos, un primer fragmento TM (residuos 61-81) un lazo luminal (aproximadamente entre los aminoácidos 82 y 149), un segundo dominio TM (150-170) y finalmente un largo extremo C-t (171-268) localizado en el citosol. Figura adaptada de (Brill et al, 2000).

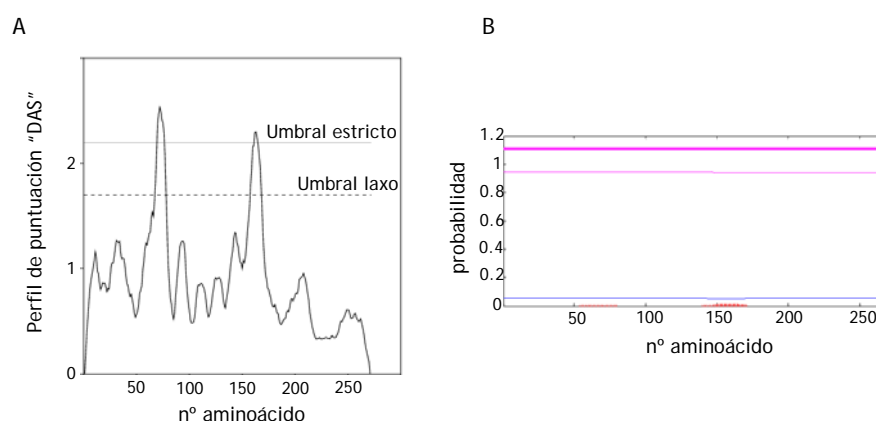
Dados nuestros resultados previos con otra MP de la superfamilia 30k (p32 del PNRSV), la cual parece asociarse a las membranas de manera periférica, y la importancia que tiene para el movimiento intercelular e intracelular del TMV la asociación de su MP a las membranas del ER (siendo además como ya se ha comentado, p30 un modelo en el estudio del mecanismo de acción del resto de MPs de la superfamilia 30k) se decidió estudiar la capacidad de p30 para asociarse a membranas, empleando para ello diversas técnicas *in silico* e *in vitro*.

#### **r.4.1 Análisis de la secuencia de la proteína de movimiento de TMV**

Ninguno de los programas de detección de fragmentos TM empleados pudo identificar dominios de anclaje a la bicapa tras el análisis de la secuencia de p30 (número de acceso en NCBI BAF93925), excepto DAS (*Dense Alignment Sequence*) (Cserző et al, 1997). Este algoritmo detectó dos secuencias lo suficientemente hidrofóbicas para insertarse en la membrana, localizadas entre los aminoácidos 68 y 78 la primera y 158 y 168 la segunda. Ninguna de estas secuencias presenta una longitud lo suficientemente larga como para considerar a estas regiones como verdaderos dominios TM. A modo de ejemplo en la [figura r.4.2](#) se muestran los resultados obtenidos con los programas de predicción DAS y TMHMM (Krogh et al, 2001).



#### Asociación a membranas de p30 del TMV

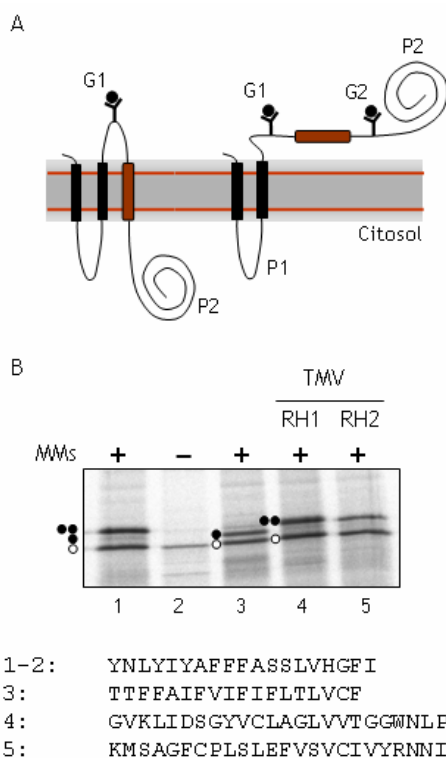


**Figura r.4.2. Análisis de la secuencia de p30.** A. Resultado obtenido empleando DAS. El programa detecta dos regiones con capacidad para insertarse en la membrana las cuales corresponden con los dos picos que superan el umbral estricto. B. TMHMM por el contrario no detecta ninguna región lo suficientemente hidrofóbica para insertarse en la bicapa, éstas deberían aparecer como un pico rojo sobre los aminoácidos con suficiente probabilidad para ser insertados. El valor de probabilidad para que el programa reconozca la secuencia como TM ha de ser cercano a 1.

#### r.4.2 Inserción de los putativos dominios TM en membranas derivadas del retículo endoplasmático

El modelo descrito por el laboratorio del Prof. Beachy (Brill et al, 2000) propone dos dominios de anclaje a la membrana los cuales corresponden aproximadamente con las regiones TM detectadas por el programa DAS. Para comprobar la capacidad de cada uno de estos segmentos para insertarse de manera independiente en membranas derivadas del ER se empleó el sistema de mapeo por glicosilación basado en la proteína Lep (apartado ex.1.2) y descrito en capítulos anteriores. Brevemente, las secuencias a estudio son insertadas en el dominio luminal P2 de Lep, donde se encuentran flanqueadas por dos dianas de glicosilación. Si se produce inserción de la putativa región TM sólo una de las dianas (G1) es glicosilada, si la secuencia es por el contrario translocada tanto G1 como G2 podrán ser glicosiladas (Hessa et al, 2005; Hessa et al, 2007) (figura r.4.3 A). El estado de glicosilación de las quimeras puede seguirse por SDS-PAGE ya que cada glicosilación aumenta la masa molecular de la proteína en aproximadamente 2.5 kDa. El resultado de la transcripción y traducción *in vitro* de las quimeras

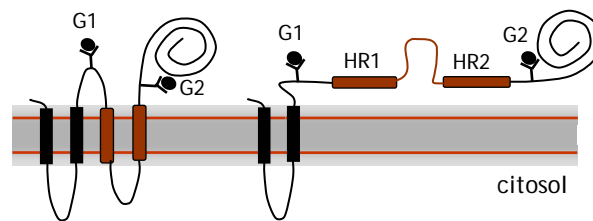
de Lep (figura r.4.3 B) muestra que tanto el primer (HR1, residuos 58–82) como el segundo (HR2, residuos 147–171) de los dominios predichos como TM por Brill et. al., (figura r.4.1), son incapaces de insertarse en la membrana a través de la maquinaria del translocón, lo que se deduce de la doble glicosilación del dominio P2 de Lep.



**Figura r.4.3. Inserción en membranas de los dominios hidrofóbicos HR1 y HR2 de p30 de TMV.** A. Esquema del ensayo de mapeo por glicosilación. B. Autorradiografía realizada tras la traducción *in vitro* en presencia de membranas y Met <sup>35</sup>S de las diferentes quimeras de Lep, como se puede ver ni la HR1 ni la HR2 del TMV son insertadas por el translocón en membranas microsomales cuando se encuentran en el contexto de Lep (carreras 4 y 5). La ausencia de glicosilación se indica con un círculo blanco, la mono-glicosilación o doble glicosilación con uno o dos círculos negros respectivamente. Las carreras 1, 2 y 3 corresponden a secuencias control descritas anteriormente (Saaf et al, 1998). Abajo se muestran las secuencias insertadas entre G1 y G2 en cada uno de los casos.

#### Asociación a membranas de p30 del TMV

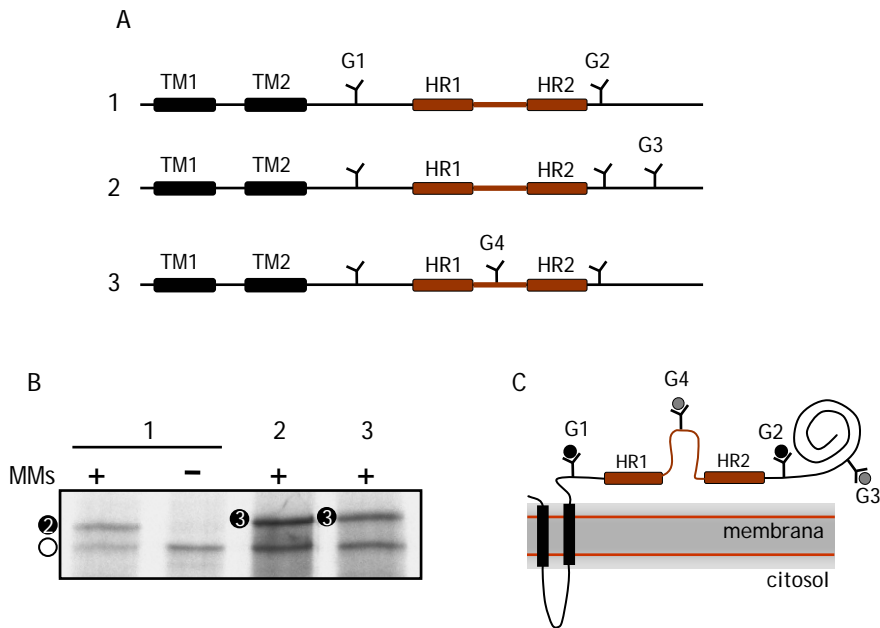
Existe la posibilidad de que los fragmentos HR1 y HR2 de TMV no sean capaces de insertarse de manera independiente pero que si lo hagan de manera coordinada, es decir, cuando ambos están presentes. Para investigar esta posibilidad se insertó la horquilla formada por HR1, HR2 y el lazo que los une (residuos del 58 al 171 en la secuencia de p30) en el sistema de Lep anteriormente descrito. En este caso tanto si la horquilla se inserta como si no ambos sitios de glicosilación G1 y G2 se localizarán en el lumen por lo que serán modificados (figura r.4.4).



**Figura r.4.4. Disposición de la horquilla de p30 de TMV en el sistema de Lep.** Las dianas de glicosilación G1 y G2 quedarán expuestas en el lumen tanto si la horquilla formada por HR1, HR2 y el lazo que las une (marrón) (residuos 57-171) es capaz de insertarse, izquierda, como si es completamente translocada, derecha.

Para poder diferenciar entre la inserción y translocación de la horquilla, se tuvo que modificar el sistema de Lep. Se realizaron dos mutantes, en el primero de ellos se añadió una diana de glicosilación extra (G3, Asn-Ser-Thr) tras la horquilla de p30, concretamente en la posición 277 del dominio P2 de Lep (figura r.4.5 A, 2). En otro mutante se insertó una diana de glicosilación (G4, Asn-Tyr-Thr) (figura r.4.5 A, 3) en el lazo que une ambas regiones hidrofóbicas, exactamente en la posición 108 de la MP del TMV. Si ambos mutantes presentan una movilidad electroforética igual y ligeramente inferior a la de la construcción de partida cuando son traducidos *in vitro* en presencia de membranas significa que las dos nuevas dianas se están glicosilando, es decir, que tanto el lazo de p30 como el extremo C-t del dominio P2 de Lep se encuentran en el lumen de los microsomas, y por tanto la horquilla de p30 no es capaz de insertarse (figura r.4.5 C). Si por el contrario esta horquilla se insertase en la membrana, la diana de glicosilación localizada en el lazo de p30 (G4) quedaría en el lado citosólico de los microsomas y no sería modificada, mientras que la diana

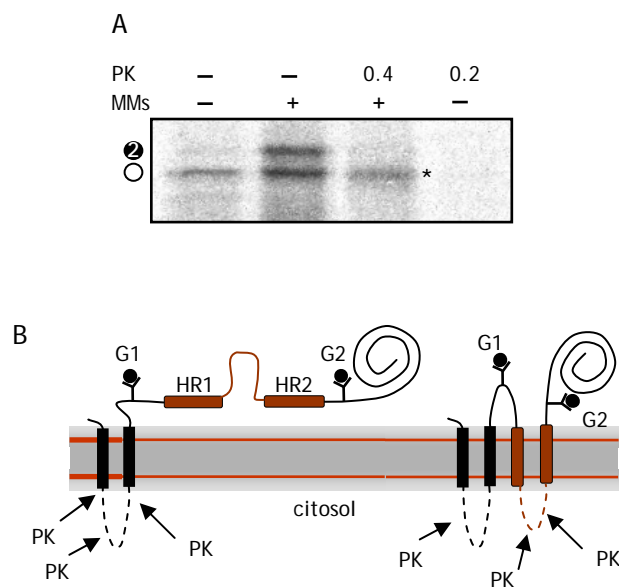
incorporada en el extremo C-t de P2 (G3) continuará siendo modificada. En este último caso existirá por tanto una diferencia en la movilidad electroforética de estos dos mutantes en una electroforesis desnaturalizante en geles de poli-acrilamida. Como se puede ver en la [figura r.4.5 B](#), los dos nuevos mutantes (2 y 3) presentan una igual masa molecular y ligeramente superior a la construcción de partida, lo que inequívocamente indica que la horquilla de p30 (residuos 58-171) no es capaz de insertarse en membranas microsomales cuando está localizada en el contexto de una proteína de membrana como Lep ([figura r.4.5 C](#)).



**Figura r.4.5. Modificación del sistema de Lep.** **A.** Mutantes realizados para el estudio de la inserción en membranas de la horquilla de p30. Construcción de partida (1) y mutantes con diana de glicosilación extra tras la horquilla de p30 (2) y en el lazo entre los dominios hidrofóbicos (3). Se muestra la horquilla de p30 (HR1-lazo-HR2) en marrón mientras que la secuencia correspondiente a Lep en negro. Las dianas de glicosilación se indican con el símbolo Y. **B.** Resultado de SDS-PAGE y posterior autorradiografía de las construcciones descritas (1, 2 y 3). Se puede observar que 2 y 3 presentan igual movilidad electroforética. El número de dianas modificadas en cada caso se indica dentro del círculo negro, el círculo blanco indica ausencia de glicosilación. **C.** Diagrama de la orientación en la membrana de los mutantes con las dianas de glicosilación G3 o G4.

### Asociación a membranas de p30 del TMV

La confirmación de estos resultados se obtuvo por medio de una digestión con PK de la construcción que contenía únicamente G1 y G2 (1, en figura 4.5 A). Si la horquilla de p30 es completamente translocada al lumen de los microsomas quedará protegida frente a la digestión (figura r.4.6 B), por el contrario si fuese capaz de insertarse el lazo de p30 sería susceptible de digestión generando un producto de digestión de menor tamaño (Lerch-Bader et al, 2008; Martínez-Gil et al, 2008) (apartado ex.3.2). Tras el tratamiento con PK se observó una banda en los geles de SDS-PAGE de un tamaño correspondiente a H2 y el dominio P2 de Lep más la horquilla de p30 (figura r.4.6 A). Lo que de nuevo indica que esta región de p30 no es capaz de insertarse en membranas microsomales.



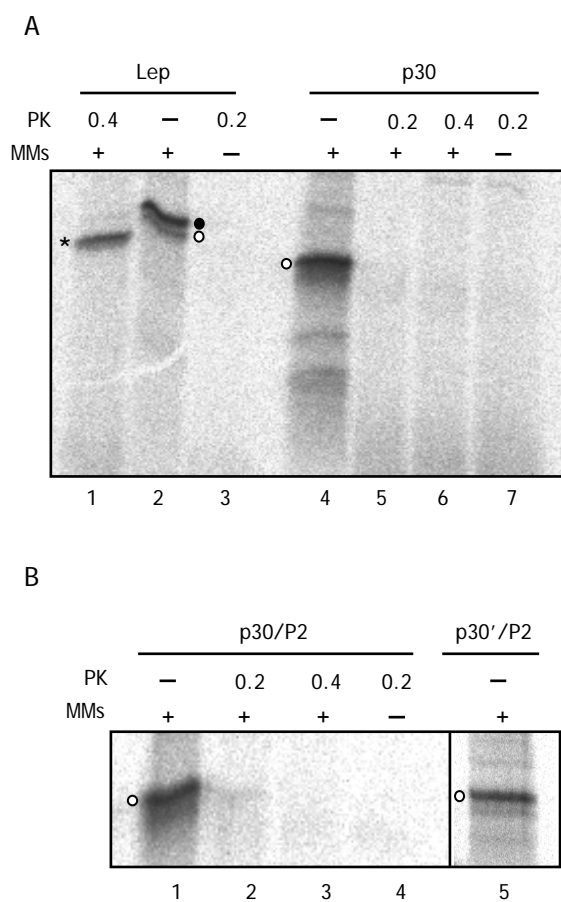
**Figura r.4.6. Digestión con PK de las regiones expuestas al citosol.** A. Resultado de la digestión con PK tras la traducción *in vitro* en presencia (+) o ausencia (-) de membranas de la quimera Lep-horquilla p30. La cantidad de PK empleada en cada carrera se indica en mg/mL. Al igual que en la figura anterior el número de dianas de glicosilación modificadas se indica dentro de un círculo negro, el círculo blanco indica ausencia de glicosilación. El asterisco señala la fracción de proteína protegida tras el tratamiento con PK. B. Esquema de la digestión con PK de la construcción en la que la horquilla formada por los dos fragmentos hidrofóbicos de p30 y el lazo que los une se introdujo en el dominio P2 de la proteína de membrana Lep. Tanto en el caso en el que la horquilla se insertase como en el que no lo hiciese. En línea discontinua se muestra la región digerida por la PK.

#### **r.4.3 p30 del Virus del Mosaico del Tabaco no es una proteína integral de membrana**

Una vez determinada la incapacidad de los fragmentos hidrofóbicos de p30 para insertarse en la membrana dentro del contexto de la proteína Lep, nos planteamos estudiar la capacidad de la proteína completa (p30) para insertarse en la bicapa lipídica. Tras la traducción de la proteína *in vitro* en presencia de metionina marcada con <sup>35</sup>S y microsomas como fuente de membranas se sometió a la mezcla de traducción a una digestión con Proteínasa K para determinar que dominios quedaban expuestos al citosol y cuales al lumen de los microsomas. Este tratamiento digirió completamente la proteína (figura r.4.7 A), lo que apunta a que p30 se encuentra enteramente localizada en el citosol y es incapaz de translocar ninguno de sus dominios al lumen de los microsomas. A modo de control se empleó la proteína integral de membrana Lep, tras la adición de PK, en este caso, se pudo ver una banda de protección correspondiente al segundo segmento TM (H2) más el dominio luminal P2 de Lep.

Para confirmar estos resultados se fusionó la MP del TMV a los 50 primeros aminoácidos del dominio P2 de Lep (p30/P2) los cuales contienen una diana de glicosilación. La traducción de esta quimera no produjo ninguna banda de glicosilación además de digerirse completamente tras el tratamiento con PK (figura r.4.7 B). Sobre esta proteína de fusión se obtuvo un mutante (p30'/P2) en el cual se añadió un sitio de glicosilación en el lazo de p30 entre los dos dominios hidrofóbicos (residuo 108). En este caso, la traducción en presencia de membranas microsomales tampoco produjo ninguna banda de mayor peso molecular debida a glicosilación. Indicando que ni el lazo entre HR1 y HR2 ni el extremo C-t son translocados al lumen. Estos resultados indican que al menos *in vitro* p30 no se inserta en membranas microsomales derivadas de ER.

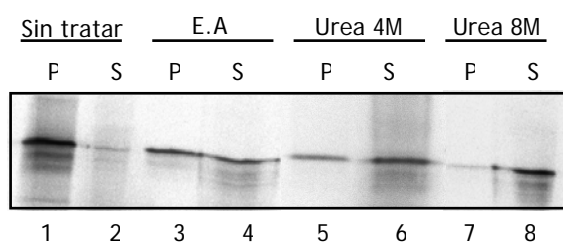
Asociación a membranas de p30 del TMV



**Figura r.4.7. Tratamiento con PK de p30 y p30/P2.** A. Traducción *in vitro* y posterior tratamiento con PK de p30, tras el cual la proteína es completamente digerida (carreras 5 y 6). Como control se empleó Lep, la cual muestra una banda resistente a la acción de la proteasa (carrera 1) ya que el H2 y el dominio C-t (P2) se encuentran protegidos frente a la digestión por los microsomas. Un círculo negro indica glicosilación mientras que uno blanco ausencia de glicosilación. El asterisco señala la banda de protección tras el tratamiento con PK. Se indican las cantidades de PK en mg/mL empleadas en cada caso. B. p30 fusionada a los 50 primeros aminoácidos de P2 (p30/P2) no es glicosilada (carrera 1) además de ser digerida por completo por la PK (carreras 2 y 3). Glicosilación que no se produjo incluso cuando se introdujo una diana de glicosilación en el lazo entre HR1 y HR2 de p30 del TMV (p30'/P2, carrera 5).

#### r.4.4 Asociación de p30 a membranas microsomales

A pesar de no ser una proteína integral de membrana p30 podría encontrarse asociada a las membranas de manera periférica al igual que ocurre con p32 del PNRSV. Tras la traducción *in vitro* de p30 en presencia de membranas estas se precipitaron mediante ultracentrifugación (apartado Ex.2). p30 se encontró junto a la fracción de membranas (sedimento de la ultracentrifugación) lo que indica que presenta algún tipo de asociación con los microsomas (figura r.4.8 carreras 1 y 2). El tratamiento con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (carreras 3 y 4) solubilizó una cantidad significativa de proteína. El tratamiento con urea 4 M (carreras 5 y 6) produjo la solubilización de más del 50% de la proteína y la incubación con urea 8M previa a la ultracentrifugación produjo la disociación de más del 95% de p30 de los microsomas, confirmando que p30 no es una proteína integral de membrana (carreras 7 y 8) sino más bien una proteína periférica.



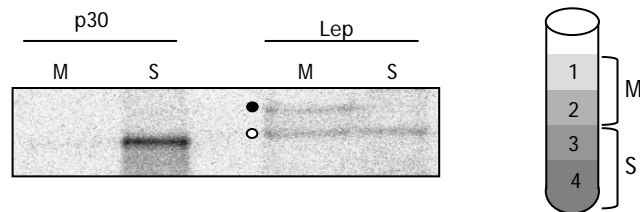
**Figura r.4.8. Asociación a membranas de p30 del TMV.** Tras la transcripción y traducción *in vitro* de p30 en presencia de microsomas la mezcla de traducción se ultracentrifugó, obteniéndose así una fracción soluble (S) y un sedimento (P) que contiene las membranas y las proteínas asociadas a éstas. El tratamiento al que fueron sometidas las muestras tras la traducción y previo a la centrifugación se indica en la parte superior de la figura (E.A extracción alcalina).

Como se ha expuesto anteriormente la flotación de membranas en gradiente discontinuo de sacarosa (apartado ex.2.3) permite separar aquellas proteínas fuertemente asociadas a la membrana de aquellas solubles o periféricas (Deitermann et al, 2005). En estas condiciones, la proteína integral de membrana Lep se concentra en la fracción de membranas (figura r.4.9, carreras 3 y 4) mientras que p30 se dirige exclusivamente a la fracción



#### *Asociación a membranas de p30 del TMV*

soluble. El comportamiento opuesto de estas dos proteínas confirma de nuevo que la MP del TMV no es una proteína integral de membrana.



**Figura r.4.9. Flotación de membranas.** Tras la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa las proteínas integrales de membrana se concentraran en la fracción de membrana (M) mientras que aquellas solubles o periféricas permanecerán en la fracción soluble (S) en el fondo del tubo de centrifugación. La glicosilación de Lep (lo que confirma su integración de en microsomas) se indica con un círculo negro, la no glicosilación con uno blanco.

#### **r.4.5 Discusión**

La asociación de la MP del TMV (p30) a las membranas de la célula es un proceso indispensable para el movimiento intra- e inter-celular del virus (Boevink & Oparka, 2005; Kawakami et al, 2004; Reichel et al, 1999). A pesar de que p30 es un referente en la virología de plantas la naturaleza de esta interacción no ha sido hasta la fecha abordada en profundidad. Con ánimo de ahondar en este aspecto se inició el estudio de la asociación a membranas de la MP del TMV. De los programas utilizados en el análisis informático de la secuencia de aminoácidos de p30 únicamente DAS detecta dos regiones con capacidad para insertarse en la bicapa (aunque ambas de una longitud insuficiente para atravesar la membrana), el resto de algoritmos no fueron capaces de identificar ningún dominio TM en p30. Los experimentos de mapeo por glicosilación mostraron claramente que ninguna de las dos regiones TM propuestas para p30 (HR1 y HR2) (Brill et al, 2000) es capaz de insertarse en membranas microsomales en el contexto de Lep de manera independiente, ni tampoco cuando están formando parte de una horquilla. Este resultado no resulta sorprendente si se analizan con detenimiento las secuencias de HR1 y HR2, ya que ambas presentan residuos polares con carga (Lys, Asp y Glu) y aminoácidos que dificultan la formación de estructuras en hélice alfa como Pro y Gly. La proteína completa tampoco es

capaz de insertarse *in vitro* en membranas microsomales derivadas del ER, lo que se desprende de los experimentos de digestión con PK y glicosilación. Finalmente una vez establecido que p30 no es una proteína de membrana, al menos *in vitro*, se planteó el análisis del tipo de asociación que p30 mantiene con las membranas microsomales. Los experimentos de sedimentación de membranas, extracción alcalina, tratamiento con urea y flotación de membranas confirman que la MP del TMV no es una proteína integral de membrana sino más bien que ésta podría asociarse a los microsomas de manera periférica aunque se desconoce el o los dominios responsables de esta interacción.

Hasta ahora se ha considerado a p30 como una proteína integral de membrana (Brill et al, 2000; Kahn et al, 1998). Nuestros resultados indican sin embargo que esta MP se encuentra asociada a las membranas de manera periférica y no atravesando la bicapa lipídica, lo cual coincide con algunos de los resultados de la bibliografía; en este sentido Heinlein y colaboradores ya apuntaron que p30 no era capaz de insertarse en membranas microsomales (Heinlein et al, 1998). En cualquier caso los extremos, N- y C-terminal, se localizarían en el citosol en cualquiera de los dos tipos de asociación (integral o periférica); lo que permite explicar los datos previos de la bibliografía que muestran interacciones entre los extremos de p30 (tanto N-t como C-t) con proteínas residentes en el citosol (Citovsky et al, 1990; Waigmann et al, 2000). La asociación de p30 a las membranas se podría realizar de varias maneras. En primer lugar la MP del TMV podría asociarse a las membranas de manera periférica por medio de algún dominio propio. En este sentido sería importante conocer la capacidad de las regiones hidrofóbicas de la MP para asociarse a membranas. Por otro lado la MP de TMV podría interactuar con alguna proteína de membrana, su localización en este caso estaría supeditada a la de la proteína de anclaje. Para poder modificar su localización, ya que se ha visto que p30 varía su patrón de localización según la fase del proceso infectivo en la que se encuentre, la MP debería ser capaz de, (1) modificar la localización de la proteína de anclaje, (2) interactuar con diferentes proteínas de membrana localizadas en diferentes microdominios de membrana de la célula huésped o (3) asociarse a una proteína de membrana que de por sí sea transportada hacia los plasmodesmos, proteína que podría ser en principio tanto del huésped como del propio virus.

### *Asociación a membranas de p30 del TMV*

En aquellos trabajos en los que se estudia la implicación de p30 en el movimiento intra e intercelular de TMV se asume que ésta es una proteína integral de membrana, al igual que en los trabajos en los que se emplea p30 como proteína modelo para profundizar en el mecanismo de transporte de proteínas de membrana a través de los plasmodesmos. En vista de los resultados obtenidos en este trabajo sería necesario replantearse los modelos propuestos para el movimiento célula-célula del TMV y para el mecanismo de transporte de los plasmodesmos. Dado el impacto que pueden tener estos resultados sobre los actuales modelos de trabajo sería necesario conocer el tipo de asociación a membranas y la disposición de p30 *in vivo*.

## R.5 DISCUSIÓN GENERAL: ANÁLISIS GLOBAL DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS MPs VIRALES Y LA MEMBRANA

A pesar de que no se conocen los detalles del proceso de transporte célula-célula de los virus de plantas es evidente que en él las membranas celulares juegan un papel fundamental. Desde las primeras etapas del ciclo infeccioso, el virus, o alguna de sus proteínas, se encuentran asociadas con algún orgánulo de la célula vegetal. En este sentido se ha demostrado que la replicación, ya ocurre asociada a las membranas del ER (Miller et al, 2003; Nagy & Pogany, 2006; Reichel & Beachy, 1998; Zhang et al, 2005), al igual que el transporte hasta los PDs (Beachy & Heinlein, 2000; Boevink & Oparka, 2005; Kawakami et al, 2004). Dada la naturaleza membranosa del canal que atraviesa los PDs (desmotúbulo) se ha especulado que el transporte del virus a través de éstos se produciría también gracias a la interacción entre las MPs del virus y el desmotúbulo (Boevink & Oparka, 2005; Heinlein et al, 1998). Pese a todo, el tipo de interacción que se establece entre las MPs viral y el sistema de endomembranas de la célula vegetal no ha sido identificado con detalle para aquellos virus que no pertenecen al TGB (Lukhovitskaya et al, 2005; Verchot-Lubicz, 2005). Es decir, los miembros de la Superfamilia 30k y del DGB.

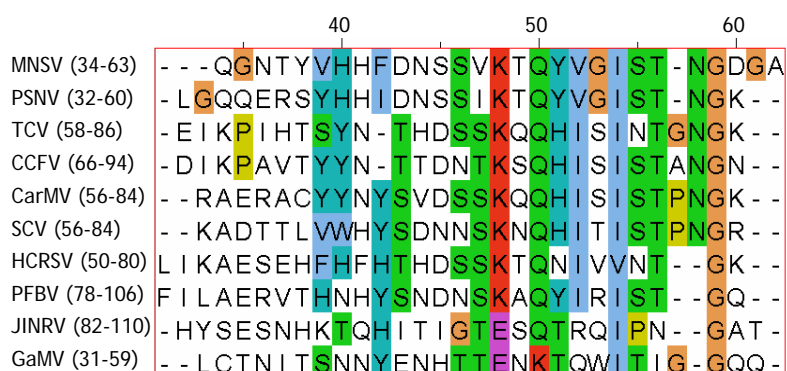
Dentro del DGB el virus más estudiado en cuanto a su relación con las membranas celulares es el CarMV, virus que contiene dos MPs p7 y p9. La primera de ellas, es una proteína soluble capaz de unir RNA (Marcos et al, 1999; Vilar et al, 2001; Vilar et al, 2005), p9 como ya se ha comentado es sin embargo una proteína integral de membrana con dos dominios TM y con los extremos amino-terminal y carboxilo-terminal orientados hacia el citoplasma (Vilar et al, 2002). Se ha propuesto que p7 reclutaría el RNA viral e interaccionaría con el extremo C-t de p9, la cual se encargaría del anclaje del complejo MPs-RNA a la membrana del ER, a través de la cual se produciría el movimiento hacia los PDs en primer término y finalmente a las células adyacentes gracias al desmotúbulo. Esta interacción entre las dos MPs no ha podido sin embargo ser demostrada hasta el momento, ni *in vivo* ni *in vitro*. Con el propósito de conocer si el tipo de interacción con las membranas de ER exhibido por la MP p9 del CarMV era una característica general de los virus del género *Carmovirus* se inició el trabajo con p7B del MNSV y con p9 del TCV.

## Discusión

Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que tanto p7B del MNSV como p9 del TCV son proteínas integrales de membrana. Es más, el análisis de la secuencia de las MPs del resto de virus del género *Carmovirus* muestra que en cada uno de los virus puede haber una MP con capacidad para insertarse en la bicapa. Ésta parece ser por tanto una característica necesaria de los virus pertenecientes al DGB para su supervivencia.

La MP p7B del MNSV, al igual que p9 del TCV, se asocia a las membranas microsomales por medio de un solo fragmento TM, a diferencia de lo que ocurre en p9 del CarMV, lo que supone que al menos uno de los extremos de estas dos proteínas debe ser translocado al lumen del ER. Dada la similitud que existe en la secuencia de los extremos C-t (figura r.5.1) de todas las MP de *Carmovirus* con capacidad potencial para interactuar con membranas, se ha propuesto una misma función para esta región en las diferentes MPs. Concretamente se ha propuesto que esta región sería la encargada de interactuar con la MP del virus con capacidad para unir el RNA viral (Vilar et al, 2002). En el caso de las MPs estudiadas en este trabajo (p7B del MNSV y p9 del TCV) el C-t se encuentra preferentemente localizado en el lumen, mientras que en p9 del CarMV este mismo extremo se orienta hacia el citosol, lo que plantea una controversia con el actual modelo.

Muy probablemente y debido a la multifuncionalidad que exhiben las proteínas virales, el extremo C-t de estas MPs es capaz de desempeñar múltiples funciones. Funciones que no necesariamente deben ser desarrolladas en un único lado de la membrana del ER. Aparentemente, estos virus han desarrollado estrategias para localizar el dominio C-t de su MP de membrana en ambos lados de la bicapa. Si bien p7B del MNSV orienta fundamentalmente su extremo N-t hacia el citosol y el C-t hacia el lumen, nuestros resultados muestran que podría existir cierta población de moléculas con una topología inversa. p9 del TCV por su parte, presenta mayoritariamente una topología igual a la de p7B, es decir N-t citosólico/C-t luminal, definida por su HR1. Para localizar el extremo C-t de la proteína en el citosol la HR2 debe insertarse en la bicapa, lo cual ocurre con muy poca probabilidad, como se desprende de los resultados del mapeo por glicosilación de cada una de las regiones hidrofóbicas de p9 del TCV y del estudio de la topología de la proteína completa.



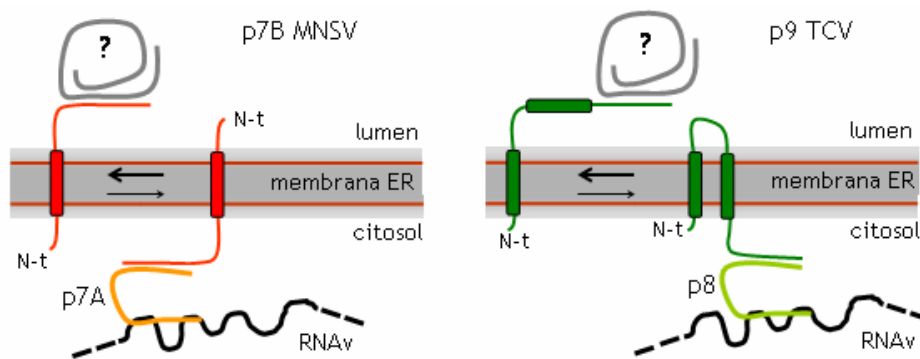
**Figurar r.5.1. Alineamiento del extremo C-t de las MP del género *Carmovirus* con capacidad para integrarse en la membrana.** Se muestra el alineamiento de los 28 últimos aminoácidos de las MP de los *Carmovirus* con potencialidad para ser proteínas de membrana, obtenido con ClustalW2 (Larkin et al, 2007) a través del servidor del EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). En la parte superior de la figura se indica la posición de los aminoácidos en la secuencia del MNSV. MNSV, *Melon necrotic spot virus* (ABC67518 en la base de datos del NCBI); PSNV, *Pea steam necrosis virus* (NP\_862838); TCV, *Turnip crinkle virus* (AAP78488); CCFV, *Cardamine chlorotic fleck virus* (AAB02618); CarMV, *Carnation mottle virus* (CAC22324); SCV, *Saguaro cactus virus* (NP\_044387); HCRSV *Hibiscus chlorotic ringspot virus* (NP\_619675); PFBV *Pelargonium flower break virus* (NP\_945126); JINRV, *Japanese iris necrotic ring virus* (NP\_038457); GaMV, *Galisonga mosaic virus* (NP\_044735). Junto a las siglas de cada uno de los virus se indican los aminoácidos de la MP incluidos en el alineamiento.

Este escenario no es del todo incompatible con el modelo de transporte intra-celular del RNA viral propuesto hasta ahora para aquellos virus pertenecientes al genero *Carmovirus* (Vilar et al, 2002) (apartado i.3.1). Así, sólo un pequeño porcentaje de las moléculas de p7B en el caso del MNSV y de p9 para TCV orientarían el C-t de la MP hacia el citosol lo que permitiría el anclaje a la membrana del ER del complejo MP soluble-RNA, como se había propuesto anteriormente. Por otro lado, la mayoría de moléculas de proteína localizaría su dominio C-t en lumen lo que permitiría su interacción con proteínas de la célula huésped localizadas en el interior del ER (figura r.5.2).

Las MPs del género *Carmovirus* a diferencia de lo que ocurre con otras proteínas integrales de membrana de bacteriófagos (Kiefer & Kuhn,

## Discusión

1999; Soekarjo et al, 1996) son incapaces de integrarse espontáneamente en la membrana, su inserción en la bicapa se produce, como se ha demostrado en esta tesis, co-traduccionalmente, y muy probablemente empleando el complejo del translocón. La topología que adquieren las MPs quedará por lo tanto definida y fijada en este proceso de integración.



**Figura r.5.2. Modelo de actuación de las MP p7B del MNSV y p9 del TCV.** La capacidad de estas dos proteínas para localizar sus extremos C-t en lados opuestos de la membrana les permite tener cierta población de moléculas que se asocian a través del C-t con la otra MP del virus en el lado citosólico para fijar el complejo MP-RNA<sub>v</sub> a la membrana, mientras que el resto de moléculas interaccionan con proteínas del huésped para realizar el resto de las funciones que se atribuyen a las MP (aumento del SEL, interacción con el citoesqueleto, etc.).

Las MPs pertenecientes a la superfamilia 30k, debido a los trabajos anteriormente realizados con la MP p30 del TMV (Brill et al, 2000), han sido consideradas hasta ahora como proteínas integrales de membrana. Tanto p30 como p32 además de asociarse a la membrana contienen un dominio de unión a RNA (Citovsky et al, 1990; Herranz & Pallas, 2004); son por lo tanto capaces de unir RNA y a su vez anclarse a las membranas del ER para facilitar el movimiento del virus de una célula a otra, con un mecanismo análogo al descrito para los *Carmovirus*.

El trabajo realizado en esta tesis con p30 del TMV y p32 del PNRSV, ambas pertenecientes a la superfamilia 30k, muestra sin embargo que estas dos MPs no son capaces de integrarse en membranas microsomaes

derivadas del ER. Sus dominios hidrofóbicos (uno en el caso de p32 y dos en el caso de p30) no son capaces de atravesar la bicapa lipídica de los microsomas, ni siquiera cuando emplean como vehículo de direccionamiento hacia el translocón la proteína integral de membrana Lep.

A pesar de la falta de integración que demuestran sus regiones más hidrofóbicas, estas MPs (tanto p30 como p32) exhiben *in vitro* una elevada capacidad para asociarse de manera periférica a las membranas. Resultado que permite explicar la localización *in vivo* de estas proteínas.

A diferencia de lo que ocurre en el caso de los virus con dos pequeñas MPs, la integración en la membrana no parece ser un requisito en la superfamilia 30k, aunque si una fuerte asociación a ésta; mediada en el caso de p32 por su única región hidrofóbica. Dado el impacto que estos resultados pueden tener en el campo de la virología de plantas ya que hasta ahora han sido consideradas proteínas integrales de membrana sería necesario comprobar el tipo de asociación que presentan estas MPs con las membranas *in vivo*.

La asociación periférica a las membranas puede presentar sin embargo ventajas, por un lado es independiente de la maquinaria celular, ya que se produce post-traduccionalmente y muy probablemente de forma espontánea de acuerdo con los datos incluidos en la presente tesis. Por otro, ofrece una mayor variabilidad y un mayor control sobre la localización de la proteína en las diferentes etapas del ciclo del virus dentro de la célula vegetal.

A pesar de las diferencias entre las pequeñas MPs de los *Carmovirus* y las de la superfamilia 30k es evidente que se requiere de la interacción entre las membranas del ER y las MPs para la viabilidad de estos virus. Esta capacidad para interactuar con membranas de una u otra manera, presente en todos los virus de plantas estudiados hasta la fecha, muy probablemente esté relacionada con la necesidad del virus de interactuar con el canal membranosos (desmotúbulo) procedente del ER que cruza los PDs, ya que ésta es la vía utilizada por todos los virus de plantas para atravesar la rígida pared vegetal y extender la infección de una célula a otra.



1. La proteína de movimiento p7B del MNSV es una proteína integral de membrana anclada a la bicapa por un único fragmento transmembrana y con una topología N-t citoplasmático/C-t luminal. La inserción de p7B en membranas derivadas del ER se produce de manera co-traduccional.
2. La hipotética proteína de movimiento p14 del MNSV sería una proteína integral de membrana, con un solo dominio transmembrana y una topología igual a la de p7B, es decir N-t citosólico/C-t luminal.
3. La proteína de movimiento p9 del TCV es una proteína integral de membrana con dos regiones hidrofóbicas pero con un solo dominio transmembrana que orienta el extremo N-t de la proteína hacia el citosol y el C-t hacia el lumen. El direccionamiento de p9 a las membranas microsomales se produce de forma co-traduccional.
4. p32 de PNRSV es una proteína asociada periféricamente a la membrana del ER a través de su única región hidrofóbica. Ésta es capaz de interactuar con monocapas y bicapas lipídicas modelo. La estructura del dominio de asociación a membranas es fundamental para el movimiento célula-célula del virus.
5. El residuo de prolina ubicado en el centro de la región hidrofóbica de p32 resulta crítico para la asociación a membranas de esta región, muy probablemente debido a las restricciones conformacionales que induce. Además, se ha demostrado que *in vivo* resulta vital para el movimiento célula-célula del virus.
6. p30, proteína de movimiento del TMV, no es una proteína integral de membrana, se encuentra sin embargo asociada a la bicapa lipídica de forma periférica.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## M.1 MATERIAL BIOLÓGICO

### m.1.1 Manipulación de *Escherichia coli*

#### Cepas empleadas

En el presente trabajo se emplearon diferentes cepas de *E.coli* tanto para la amplificación del DNA plasmídico como para la sobre-expresión de proteínas recombinantes. En la siguiente tabla (tabla m.1) se resume la procedencia y la utilidad de cada una de ellas.

**Tabla m.1 Cepas de *E. coli* empleadas**

Cepa	Procedencia	Utilidad
DH5 $\alpha$	Cepa preparada en el laboratorio según Sambrook et al 1989	Empleada para la amplificación y transformación rutinaria de DNA plasmídico
XL1Blue	Cepa obtenida comercialmente procedente de Stratagen (La Jolla, EE.UU)	Amplificación y transformación del DNA sometido a mutagénesis dirigida
BL21	Cepa obtenida siguiendo el protocolo descrito por Sambrook et al 1989	Expresión de proteínas de fusión.
JM110	Preparada según Sambrook et al 1989	Amplificación de DNA no metilado para su posterior tratamiento con el enzima Bcl I

Genotipo **DH5 $\alpha$** : F- end A1 hsd R17 (rk-, mk-) sup E44 thi-1 l- rec A1 gyr A96 rel A1 D(arg F- lac ZYA) U 169 y80d lacZDM15

Genotipo **XL1Blue**: rec A1 end A1 gyr A96 thi-1 hsd R17 (rk-, mk-) sup E44 rel A1 lac {F' pro AB lacIqZ M15 Tn 10 (tetr)}

Genotipo **BL21 (DE3) pLysS**: F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysS (CmR)

Genotipo **JM110**: rpsL (Strr) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44  $\Delta$  (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZ $\Delta$ M15]

### **Condiciones de crecimiento**

Para el crecimiento de las diferentes cepas de *E. coli* en medio líquido se empleó LB (*Lysogenic broth*, *Luria broth* o *Luria-Bertani broth*) autoclavado 20 minutos a 121° C y 1 atmósfera de presión; compuesto de: extracto de levadura 0.5% (p/v) (Pronadisa), triptona 1% (p/v) (Pronadisa) y NaCl 1% (Sigma). Para el crecimiento en medio sólido al medio LB se le añadió agar bacteriológico 1.5% (p/v) (Pronadisa). Tanto el medio líquido como el sólido fueron suplementados con el antibiótico requerido en cada caso. Las células se cultivaron a 37° C con agitación (250 rpm) durante un periodo de tiempo variable según el experimento.

### **Transformación**

La transformación de DNA se realizó sobre células competentes preparadas mediante el método del Cloruro de Rubidio (Sambrook et al, 1989). Junto a 50 µL de células competentes se incubaron 10 ng de DNA en hielo durante 30 minutos, a continuación la mezcla se sometió a choque térmico (42° C, 1 min. y 30 s) después del cual las células se mantuvieron 5 minutos en hielo, tras los cuales se añadieron 500 µL de LB y se dejaron crecer las células durante 50 min. a 37° C y 175 rpm. Pasado este tiempo el cultivo celular fue centrifugado (3000 rpm 3 minutos) y 400 µL de sobrenadante eliminados. A continuación las células fueron resuspendidas en el volumen restante (aproximadamente 100 µL) y sembradas en una placa *petri* de LB suplementada con el antibiótico requerido. Dichas placas se mantuvieron en un incubador a 37° C durante al menos 12 horas.

En aquellas ocasiones que se requería una alta eficiencia de transformación se recurrió a la transformación de DNA por medio de electroporación. En este caso 50 µL de células electro-competentes se incubaron con 5 ng de DNA plasmídico. A continuación las células fueron sometidas a un choque eléctrico de 1.8 kV/cm<sup>2</sup> durante 5 mili segundos, para lo cual se emplearon cubetas de electroporación con una distancia entre los electrodos de 0.1 cm. Para permitir la recuperación de las células a la mezcla de transformación se le añadió medio LB y se mantuvo a 37° C durante 45 minutos, pasados los cuales las células fueron sembradas en una placa *petri* como se explica anteriormente.

### **m.1.2 Manipulación de *Nicotiana tabaccum***

#### **Transfección de RNA a plantas transgénicas P12 y protoplastos**

El DNA codificante para el RNA genómico del PNRSV fue linearizado con *Pst I* (Fermentas) y tratado posteriormente con T4 DNA polimerasa para generar extremos romos. El DNA fue entonces sedimentado y resuspendido en agua mili Q libre de RNasa. Los transcritos obtenidos mediante transcripción *in vitro* (apartado m.3.1) se utilizaron para infectar hojas de plantas transgénicas P12 de *Nicotiana tabaccum* y protoplastos derivados de éstas. En el caso de los protoplastos se empleó el método del Polietilenglicol descrito en la referencia (Loesch-Fries et al, 1985). Para las plantas transgénicas se empleó un método mecánico; a 10 µL de la mezcla de traducción se le añadió tampón de inoculación 10x (100 mM glicina, 60 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2% bentonit y 0.2% celit pH 9.2) y carburundum. Dicha mezcla fue frotada sobre las hojas de la planta. Transcurridos 2 y 4 día de la infección se buscó la presencia de focos infecciosos utilizando un microscopio confocal TCS SL Leica (con los filtros BP/450-490 LP 515) empleando la GFP como indicador de la infección (longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión entre 500 y 535 nm).

## **M.2 AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE DNA**

### **m.2.1 Aislamiento de DNA plasmídico**

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala y procedente de *E. coli* se empleó el sistema extracción comercial conocido como *QIAprep Spin Miniprep kit* (Hilden, Alemania Quiagen).

### **m.2.2 Secuenciación de DNA**

Las reacciones de secuenciación del DNA plasmídico se realizaron de manera automática en el *Servei de Seqüenciació de la Universitat de València* (S.C.S.I.E) La reacción de marcaje se realizó empleando el *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* de Applied Biosystems (Foster City, California, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. En dicha reacción tras un primer paso de 1 minuto a 95° C se sometió a la mezcla de reacción a 99

ciclos, cada uno de los cuales constituido por 10 segundos a 95° C, 5 segundos a 50° C (como etapa de hibridación) y 4 minutos a 60° C.

### **m.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron en un termociclador *Eppendorf Mastercycler Personal* (Hamburgo, Alemania). La mezcla de reacción presentaban 0.1-1 ng de DNA molde, 1 mM de cada oligonucleótido (servidos por Isogen Life-Science (Maarsen, Holanda)), dNTPs 0.25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 1 unidad de Taq polimerasa *BioTaq* (Bioline, Londres, UK) y la cantidad de tampón 10x adecuada para un volumen final de reacción de 25 µL ajustado con H<sub>2</sub>O milliQ esterilizada. Para la amplificación del DNA de manera rutinaria se utilizó el siguiente programa: 2 min a 95° C de desnaturalización inicial seguidos de 30 ciclos (95° C 30 s, 52° C 1 min., 72° C 1 min.) para finalizar con una extensión final de 5 min. a 72° C. Para la purificación del DNA obtenido se empleó un sistema comercial de purificación de productos de PCR (*QIAquick PCR purification kit Qiagen*) si el tamaño de DNA amplificado era mayor de 200 pares de bases. Para fragmentos de PCR más pequeños se optó por la precipitación del DNA mediante deshidratación con etanol (Sambrook J et al 1989).

### **m.2.4 Reacciones de mutagénesis dirigida**

Para la realización de mutagénesis dirigida se empleó el sistema comercial *Quikchange* (Stratagene, La Jolla, EE.UU). Una vez realizada la mezcla de reacción (5 µL tampón de reacción 10x, 1 µL mezcla de dNTPs 25 mM, 100-250 ng de cada uno de los oligos y 2.5 U de Pfu Turbo en 50 µL de reacción ajustados con agua miliQ) ésta se sometió a 20 ciclos de amplificación ajustando la temperatura de hibridación según la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de los oligos. Cada ciclo de amplificación consta de un primer paso de 30 segundos a 94° C seguido por 1 minuto a la temperatura de hibridación seleccionada y 10 minutos a 68° C para la amplificación del plásmido. El DNA resultante fue sometido a digestión con *Dpn I* (enzima que reconoce únicamente el DNA metilado), y seguidamente transformado en *E. coli XL1 Blue* utilizando 1 µL del producto de PCR. Para seleccionar las células transformadas estas se sembraron en placas de LB que presentaban el

antibiótico requerido e incubadas a 37° C durante 12 h. El resultado de la mutagénesis fue comprobado mediante.

### **m.2.5 Digestiones y ligaciones de DNA**

Para la realización de las construcciones empleadas en este trabajo tanto los insertos (obtenidos por PCR) como los vectores pertinentes fueron digeridos con los enzimas adecuados en un volumen de reacción de 25 µL siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente los insertos fueron purificados empleando el paquete comercial *QIAQuick PCR purification kit*. Los vectores se purificaron en gel mediante el sistema *QIAquick Gel Extraction*. Ambos productos de Qiagen (Hilden, Alemania).

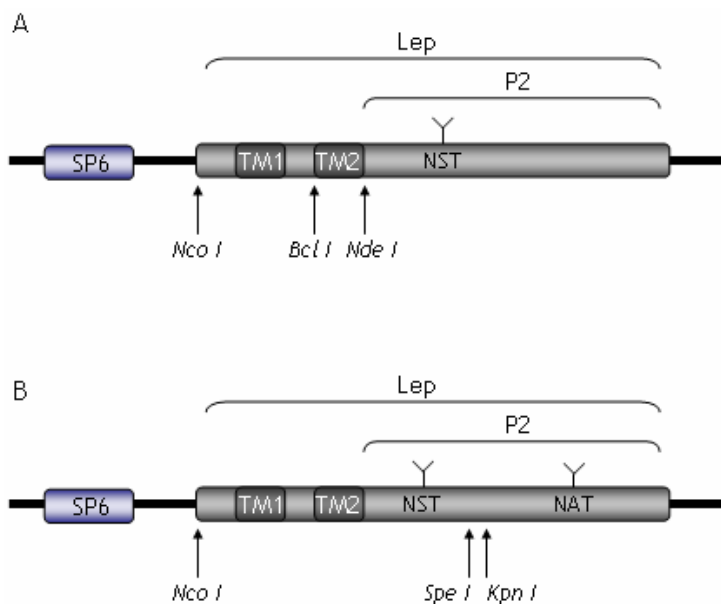
Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen final de 10 µL con una relación inserto vector 3:1 durante una noche a 16° C. El producto de la ligación se transformó en células DH5α seleccionadas con el antibiótico correspondiente. La secuencia de las construcciones fue comprobada por secuenciación de DNA.

### **m.2.6 Vectores utilizados y diseño de construcciones**

#### **pGEM-Lep**

Para los estudios de inserción en membranas, así como para alguno de los ensayos topológicos, se empleó el plásmido pGEM-Lep (Prof. von Heijne, Univ. Estocolmo, Suecia). Aprovechando las dianas de restricción para las enzimas *NcoI* y *NdeI* se subclonaron bajo el promotor SP6 las secuencias de las MPs p7B, p14, ambas pertenecientes al MNSV, p9 de TCV, p32 del PNRSV y p30 de TMV así como la primera región TM y el dominio luminal de p9 del CarMV; quedando todas fusionadas a la región que codifica para el dominio P2 de la proteína Lep de *E. coli* (figura m.1 A). Empleando una combinación adecuada de oligos directo y reverso sobre este plásmido se obtuvieron por PCR fragmentos de DNA, para su posterior transcripción y traducción *in vitro*, que codifican únicamente para la secuencia de la MP o para una fusión entre la MP y los 50 primeros aminoácidos de P2 o entre la MP y el dominio P2 completo. Para estudiar la capacidad intrínseca de la región hidrofóbica de p32 para insertarse en membranas biológicas se

sustituyó el segundo fragmento TM de Lep por la región a estudio, utilizando los sitios de restricción *Bcl I* y *Nde I* (figura m.1 A). Las secuencias que codifican para las regiones hidrofóbicas de los virus MNSV, TCV y TMV fueron introducidas entre las dianas de restricción para *Spe I* y *Kpn I*, en la secuencia de Lep que codifica para una segunda diana de glicosilación en la posición 258. La horquilla formada por las dos regiones hidrofóbicas de TMV y el lazo que las une también fue introducida entre los sitios *Spe I* y *Kpn I* (figura m.1 B).



**Figura m.1. Construcciones derivadas de pGEM-Lep.** DNA de partida para la obtención de las construcciones utilizadas en los estudios topológicos y de inserción en membranas. Se indica la posición de los sitios de restricción y de las dianas de glicosilación una vez el mRNA haya sido traducido (Y).

### pWaldo-GFP

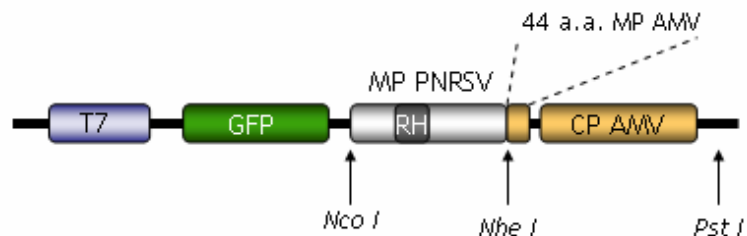
Para realizar estudios de topología en *E.coli* se emplearon construcciones derivadas del plásmido pWaldo-GFP (Waldo, 2003). El cual presenta en el esqueleto del pET28 bajo el promotor T7 la secuencia de la GFP. Utilizando los sitios de restricción *EcoR I* y *Nde I* se obtuvieron secuencias de DNA



codificantes para las proteínas de fusión p7B-GFP y TM2-GFP. Como controles topológicos se emplearon las fusiones a GFP, Lep-GFP e InvLep-GFP (de Gier et al, 1996; Drew et al, 2001).

### pX032

Un vector derivado del pX032 modificado por (Sanchez-Navarro et al, 2001) y cedido por el Prof. Vicente Pallás (I.B.M.C.P, Valencia) (Herranz & Pallas, 2004) fue utilizado en los ensayos de movimiento del PNRSV. El plásmido consta del promotor T7, la GFP, una versión quimérica de la MP del PNRSV que presenta en el extremo carboxilo terminal 44 nucleótidos de la MP del AMV y finalmente la CP del AMV (figura m.2). En el extremo 3' de dicha región (clon infeccioso) tras la CP del AMV existe un sitio de restricción *Pst I* que permite la linearización del DNA previa a su transcripción *in vitro* (apartado m.3.1).



**Figura m.2. RNA viral empleado en los ensayos de actividad de la MP del PNRSV.** El cDNA 3 modificado del AMV fue utilizado para comprobar la actividad *in vivo* de la MP del PNRSV. En la figura se muestran las proteínas que expresa la construcción así como alguno de los sitios de restricción que ésta presenta.

### m.2.7 Mutantes utilizados

En las tablas que aparecen a continuación se muestran los diferentes mutantes utilizados en este trabajo, realizados a partir de los plásmidos y construcciones descritas anteriormente.

Materiales y Métodos

Tabla m.2 Mutantes para el estudio *in vitro* de la topología y la capacidad de inserción en membranas

Mutante	Plásmido de origen	Características
p7B NST	pGEM-p7B-P2	Inserción de diana de glicosilación en el extremo N-t de p7B, entre la Ala 2 y la Cys 3
p7B ΔNSS	pGEM-p7B-P2	Eliminación de la diana natural de glicosilación de p7B, mediante el cambio de la Asn45 por Met.
p14 ΔNSS	pGEM-p14-P2	Eliminación de la diana natural de glicosilación de p14, mediante el cambio de la Asn 45 por Met.
p7BΔH	pGEM-p7B-P2	Eliminación de la región hidrofóbica de p7B
p32 G8 G130	pGEM-p32-P2	Sustitución de Pro 8 y Ala 130 por Thr para obtener dianas de glicosilación en N-t y C-t
p32 P96A Q99L	pGEM-p32-P2 G8G130	Cambio de la Pro 96 y la Glu 99 de la región hidrofóbica de p32 por Ala y Leu respectivamente
Lep p32 P96A	pGEM Lep(TM1-RHp32)	Cambio de la Pro de la región hidrofóbica de p32 por Ala
Lep p32 P96A Q99L	pGEM Lep(TM1-RHp32)	Cambio de la Pro y la Glu de la región hidrofóbica de p32 por Ala y Leu respectivamente
Lep G277	pGEM Lep(TM1-TM2-horquilla p30)	Inserción de diana de glicosilación en a.a 277 de de dominio P2 de Lep
p30 G108	pGEM Lep(TM1-TM2-horquilla p30)	Introducción de diana de glicosilación en posición 108 de p30 de TMV

Tabla m.3 Estudio de la topología *in vivo*

Mutante	Plásmido de origen	Características
p7B3K-GFP	p7B-GFP	Inserción de tres Lys en C-t de fragmento hidrofóbico de p7B 37, 38 y 39
TM2-GFP R60E	TM2p9-GFP	Sustitución de la Arg 60 por Glu en el lazo luminal de p9 del CarMV
TM2-GFP K75E	TM2p9-GFP	Sustitución de la Ly 75 por Glu en el lazo luminal de p9 del CarMV
TM2-GFP R60E K75E	TM2p9-GFP	Sustitución de la Arg 60 y la Lys 75 por Glu

Tabla m.4 Estudio del papel de la RH de p32 en el movimiento célula-célula del virus

Mutante	Plásmido de origen	Características
p32 $\Delta$ H	p32 en RNA3 AMV	Eliminación región hidrofóbica de p32
p32 P96A	p32 en RNA3 AMV	Cambio de la Pro 96 de la región hidrofóbica de p32 por Ala
p32 clon Q99L	p32 en RNA3 AMV	Cambio de la Glu 99 de la región hidrofóbica de p32 por Leu
p32 P96A Q99L	p32 en RNA3 AMV	Cambio de la Pro 96 y la Glu 99 de la región hidrofóbica de p32 por Ala y Leu respectivamente
p32 T101,102A	p32 en RNA3 AMV	Cambio de las Thr 101 y 102 por Ala

### M.3 TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN *IN VITRO*

#### m.3.1 Transcripción *in vitro*

Para la obtención de los diferentes RNA el fragmento de DNA correspondiente fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos directo y reverso adecuados. Los productos de PCR que contenían el

## *Materiales y Métodos*

promotor SP6 fueron transcritos *in vitro* utilizando el sistema *RiboMAX large scale RNA production system SP6* de Promega (Madison, WI, U.S.A) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA resultante fue purificado usando el sistema de purificación de RNA de Qiagen (*RNeasy RNA clean up kit*).

Para aquellos fragmentos de DNA que presentaban el promotor T7 se realizó una mezcla de reacción que contenía 1 µg de DNA, 1.5 µL de una solución 10 mM de rNTPs, 40 U de inhibidor de RNasa (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada), 30 U de T7 RNA polimerasa (Fermentas) y 1.5 µL del tampón 10X proporcionado por el fabricante de la T7 RNA polimerasa en un volumen final de 15 µL.

### **m.3.2 Traducción *in vitro***

Los mRNA fueron traducidos en presencia de 10 µL de extracto de lisado de reticulocitos (Promega) o extracto de germen de trigo (Promega), 0.2 µCi de metionina marcada radiactivamente [<sup>35</sup>S–Met] (Amersham BioScience), 0.5 ml de una mezcla de aminoácidos excepto metionina, 1 µg de mRNA y 1 µL de microsomas derivados de ER de páncreas de perro (Promega) en los experimentos en los que se requería la presencia de membranas. La reacción se realizó a 30° C durante 2 horas (Vilar et al, 2002).

### **Ensayo de inserción co/post-traducciona**

Para los estudios de inserción co-traducciona o post-traducciona en membranas de las MP de interés la secuencia se amplificó por PCR tal y como se explica en el apartado m.2.3. El DNA fue transcrito *in vitro* empleando la SP6 RNA polimerasa. Los mRNA fueron traducidos durante 1 hora a 30° C en lisado de reticulocito en presencia de metionina marcada con [<sup>35</sup>S], mezcla de aminoácidos sin metionina y microsomas en los experimentos de inserción co-traducciona, tal y como se describe en el apartado anterior. En los ensayos de inserción post-traducciona las membranas se añadieron después de inhibir la traducción empleando cicloheximida (2 mg/mL) durante 10 minutos a 26° C. Posteriormente las muestras se incubaron con membranas durante 1 hora para permitir la translocación antes de proceder a la sedimentación de membranas mediante ultracentrifugación.

### **m.3.3 Sedimentación de membranas, tratamiento con Urea, extracción Alcalina y reparto de fases con Triton X-114**

#### **Sedimentación de membranas**

Para la sedimentar membranas tras la traducción *in vitro*, al producto de la reacción se le añadieron 8 volúmenes del tampón A (35 mM Tris-HCl a pH 7.4 y 140 mM de NaCl). La mezcla fue depositada sobre 50  $\mu$ L de tampón A suplementado con 0.2M de sacarosa y sometida a ultracentrifugación (20 minutos 100.000 g a 4<sup>o</sup> C) en una centrífuga Beckman TL 100 con un rotor TLA-55 o TLA-45. Finalmente tanto el precipitado como el sobrenadante fueron analizados por SDS-PAGE y posterior autorradiografía.

#### **Flotación de membranas**

Para estudiar la capacidad de ciertas proteínas para asociarse a las membranas biológicas se empleó una técnica de centrifugación conocida como flotación de membranas (Deitermann et al, 2005; Moise et al, 2004). A la mezcla de traducción en presencia de membranas (apartado m.3.2) se le añadió 50  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M pH 11 y se dejó incubar la mezcla durante al menos 1 hora en hielo. A continuación empleando una solución de sacarosa 4M en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M pH 11 y el mismo tampón en ausencia de sacarosa se ajusto la solución a un volumen de 475  $\mu$ L y una concentración de sacarosa de 2M. Dicha mezcla se depositó en el fondo de un tubo de centrifuga de Policarbonato (11 x 34 mm) de Beckman (Beckman Instruments, Palo Alto, California, USA). Sobre la solución de sacarosa 2 M se depositaron cuidadosamente 275  $\mu$ L de 1.25M de sacarosa Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M pH 11 y enzima de todo 250  $\mu$ L de 0.25M sacarosa en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M pH 11. Todo el gradiente se centrifugó en una ultracentrífuga Beckmann TL 100 empleando un rotor basculante (TLS-55) durante 4 horas a 55000 rpm y 4<sup>o</sup> C. Tras la centrifugación 4 fracciones de 250  $\mu$ L se extrajeron cuidadosamente empezando por la parte superior, donde se encuentran las membranas, resuspendiendo en la última de ellas el precipitado. Cada una de las fracciones fue analizada por SDS-PAGE y posterior autorradiografía, determinando en cada caso en qué fracción/es se encontraba la proteína a estudio.

### **Tratamiento con urea y extracción alcalina**

Para el estudio del grado de asociación de las proteínas a las membranas éstas se sometieron a un tratamiento con urea o a una extracción alcalina dependiendo del caso (Garcia-Saez et al, 2004). Ambos procesos se realizan siguiendo el mismo procedimiento que la sedimentación de membranas pero suplementando el tampón A con Urea 4 M o 8 M según el caso para el tratamiento con Urea y con 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.5) en el caso de la extracción alcalina. Tras la centrifugación tanto el precipitado como el sobrenadante fueron analizados por SDS-PAGE.

### **Reparto de fases con Triton X-114**

Al producto de la reacción de traducción *in vitro* en presencia de microsomas se le añadió 1/5 vol de Triton X-114. Tras una incubación de 30 minutos en hielo y 10 minutos a 37° C, para permitir la formación de una fase orgánica y otra acuosa las muestras se sometieron a centrifugación a 10.000 g a temperatura ambiente. La fracción inferior (rica en detergente) fue entonces lavada dos veces mediante la adición de 10 volúmenes de tampón A sin detergente y la repetición del proceso de separación de fases. El contenido proteico de las dos fases fue analizado por SDS-PAGE y posterior autorradiografía tras la precipitación de las proteínas con acetona (Navarro et al, 2006).

### **m.3.4 Tratamiento con Proteinasa K**

Tras la traducción *in vitro* en presencia o ausencia de membranas (según el requerimiento) a las muestras seleccionadas se les añadió 1 µL de PK a una concentración de 2mg/mL y 1 µL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y se las incubó 45 minutos en hielo. Para detener la digestión se añadió 1 µL de PMSF a una concentración de 0.2M. La centrifugación de membranas se realizó según el protocolo descrito en el apartado m.3.3 con la excepción de que se empleó un tampón HEPES 140 mM, acetato magnésico 4 mM y acetato potásico 100 mM suplementado con PMSF 1 µM (concentración final). El sedimento, conteniendo las membranas y las proteínas asociadas a éstas se analizó por electroforesis en geles de acrilamida.

### **m.3.5 Deglicosilación con Endoglicosidasa H**

Con el fin de eliminar los residuos de azúcar añadidos por la Oligo-Sacaril-transferasa al resultado de la traducción *in vitro* en presencia de membranas microsomales se le añadió 6 volúmenes de Citrato tri-sódico 70 mM pH 5.5 (tampón A). La mezcla se depositó sobre 50  $\mu$ L de tampón A 0.2 M sacarosa y se sometió a centrifugación (25 minutos 40.000 rpm, Beckman TL 100 rotor TLA-45). El precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ L de tampón A (1% SDS 5%  $\beta$ -mercaptoetanol) y se sometió 10 minutos a 95° C. Posteriormente se añadió 0.1 mU/ $\mu$ L de Endoglicosidasa H y se incubaron las muestras 1 hora a 37° C. Tras la incubación las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior autorradiografía.

### **m.3.6 Marcaje específico de de cisteínas**

#### **Marcaje con AMS**

Para el marcaje de cisteínas se utilizó la sal disódica del ácido 2,2'-disulfónico 4-acetamido-4'-maleimidilstilbeno (AMS) de *Molecular Probes* (Invitrogen California, EE.UU.) a una concentración de 10 mM en presencia de EDTA 3 mM (Joly & Swartz, 1997). Tras una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente las membranas se recuperaron mediante sedimentación.

#### **Marcaje con MAL-PEG**

El marcaje específico de Cys empleando un derivado del polietilenglicol conocido como mPEG-SMB-5000 (Maleimida-Metoxi polietilen-glicol, MAL-PEG) de Nektar (Nektar Therapeutics, Huntsville, Alabama, USA) se realizó basándose en el protocolo descrito por Deutsch y colaboradores (Lu & Deutsch, 2001). En este protocolo experimental tras la transcripción y traducción *in vitro*, las membranas fueron precipitadas como se ha descrito previamente y resuspendidas en PEG-PBS (137 mM NaCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 15.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1 mM DTT, pH 7.3) con o sin SDS (1%). En las muestras que lo requerían se añadió 50  $\mu$ L de 40 mM MAL-PEG disuelto en PEG-PBS sin DTT, en el resto, 50  $\mu$ L del mismo tampón sin MAL-PEG, de manera que para todas las muestras la concentración final de DTT fue de 20mM. Tras un periodo de 12 horas a 4° C se añadió 10  $\mu$ L de tampón de carga (7.2% SDS, 2 M Tris base, 34% glicerol,

## *Materiales y Métodos*

171 mM de DTT, 0.85% de azul de bromofenol). Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y posterior autorradiografía (Drew et al, 2006).

### **M.4 ENSAYO TOPOLÓGICO BASADO EN LA GFP**

Para la expresión de fusiones a la GFP se siguió el protocolo descrito en (Drew et al, 2002). Las colonias seleccionadas se inocularon en cultivos de LB con Kanamicina (50 µg/mL) y Cloranfenicol (30 µg/mL) y se crecieron durante al menos 12 horas a 37° C. A continuación los cultivos se diluyeron 1000 veces en un volumen total de 20 mL de LB en presencia de antibióticos. Los cultivos se dejaron crecer a 37° C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (OD) a 600 nm de 0.4. A dicha OD se añadió IPTG (concentración final de 0.5 mM) permitiendo que los cultivos alcanzasen una OD igual a 2. Las células fueron recogidas por centrifugación (3000 rpm 5 minutos) y resuspendidas en 1 mL de 50 mM Tris-HCl a pH 8.0, 200 mM NaCl, y 15 mM EDTA. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente se midió el espectro de emisión de fluorescencia entre 495 y 530 nm con una longitud de onda de excitación de 485 nm en un fluorímetro Perkin Elmer LS 50 B.

### **M.5 ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS VIRALES**

Para la predicción de fragmentos TM en las proteínas a estudio se emplearon diferentes programas todos ellos disponibles en la red:

PHDhtm (Rost et al, 1996) <http://www.predictprotein.org>  
SOSUI (Hirokawa et al, 1998) <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>  
TmPred (Hofmann, 1993) [http://www.ch.embnet/cgi-bin/TMPRED\\_from.htm](http://www.ch.embnet/cgi-bin/TMPRED_from.htm)  
SPLIT (Juretic et al, 1993) <http://split.pmfst.hr/split/4/>  
MEMSAT (Jones et al, 1994) <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk>  
DAS (Cserző et al, 1997) <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>  
TMHMM (Krogh et al, 2001) <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>  
HMMPRED (Tusnady & Simon, 2001) <http://www.enzim.hu/hmmpred/>  
TOPPRED (Claros & von Heijne, 1994) <http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/>  
ΔG prediction server (Hessa et al, 2007) <http://www.cbr.su.se/DGpred/>



Todos los parámetros se dejaron en sus valores por defecto excepto aquellos que hacen referencia al reino al que pertenece el organismo cuya secuencia está siendo analizada.

## **M.6 SÍNTESIS QUÍMICA EN FASE SÓLIDA Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS**

La síntesis en fase sólida de los péptidos empleados (RVFLVYVPIIQATTSGILTLK-NH<sub>2</sub> y RVFLVYVAILATTSGILTLK-NH<sub>2</sub>) se realizó de manera automática empleando un sintetizador 433A de Applied Biosystems. La síntesis se basó en la química *Fmoc* descrita por Fields G.B. y Noble R.L (Fields & Noble, 1990). Se empleó una resina de poliestireno AM RAM de 0.74 meq/gr (RAPPpolymere). Los aminoácidos se obtuvieron de Senn Chemicals e Iris Biotech, el resto de reactivos de Sigma, Merck y Applied Biosystems. Para la purificación de los péptidos se empleó cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RT-HPLC) utilizando una columna preparativa C18 Lichrosorb RP-18 (Merk, Rahway, USA) y un sistema de cromatografía Delta Prep 3000 de Waters. Las fracciones obtenidas se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOFF para comprobar la masa molecular de los péptidos sintetizados en el Servicio de Proteómica de la Universidad de Valencia (S.C.S.I.E).

## **M.7 DICROÍSMO CIRCULAR**

Los espectros de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-810 CD unido a un baño Neslab RTE 110 y un controlador de temperatura. Los espectros obtenidos son una media de al menos 10 barridos de cada muestra, tomados a intervalos de 0.2 nm. Como blanco o línea base se empleó un espectro realizado únicamente con tampón. La concentración de péptido se ajustó a 30  $\mu\text{M}$  en todos los casos. Dicha concentración se determinó por espectroscopia UV empleando un coeficiente de extinción molar para la Tyr de  $\epsilon_{280}=1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## **M.8 INSERCIÓN DE PÉPTIDOS EN MONOCAPAS LIPÍDICAS**

La inserción de péptidos en monocapas de fosfolípidos con diferente presión superficial inicial ( $\pi_i$ ), se monitorizó midiendo los cambios de presión superficial con el tiempo ( $\Delta\pi$ ) tras la inyección de la solución de péptido en la subfase (agua bi-distilada) de la monocapa. Para la realización de las medidas se empleó una balanza de monocapas Langmuir-Blodgett (NIMA Technologies, Coventry, UK) acoplada a un controlador de temperatura el cual se mantuvo a 25° C. Las monocapas de fosfolípido se obtuvieron depositando una solución concentrada de lípido (POPC o POPG) en cloroformo/metanol (3:1 v/v) sobre la superficie acuosa. Tras 10 minutos de estabilización 5  $\mu\text{g}$  de péptido disuelto en metanol se inyectaron en la subfase calculándose el incremento de presión producido. La subfase fue agitada y mantenida a 25° C continuamente.

La representación gráfica de  $\Delta\pi$  frente la presión inicial permite calcular la presión crítica de inserción ( $\pi_c$ ), definida como la máxima  $\pi$  a la cual el péptido puede insertarse en la monocapa lipídica.

### **Isotermas de lípido, péptido y péptido/lípido**

Las monocapas se realizaron depositando mezclas concentradas de lípido, péptido o lípido/péptido disueltas en cloroformo/metanol sobre la superficie de la subfase en un balanza Langmuir-Blodgett (NIMA Technologies, Coventry, UK) atemperada a 25° C, tras 10 minutos de reposo para permitir la evaporación del disolvente el área de la interfase fue comprimida a medida que se monitorizaba las variaciones en la presión superficial.

## **M.9 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS**

Antes de la electroforesis las muestras fueron suplementadas con tampón de carga (concentración final Tris-HCl 625 mM pH 6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 4% (v/v), azul de bromofenol 0.025% (p/v)) y sometidas a desnaturalización durante 5 minutos a 95° C. Las electroforesis se hicieron a un amperaje constante de 16 mA y un voltaje máximo de 110 V, empleando geles con un porcentaje de poli-acrilamida del 12%, 15%, 16% y 20% según los casos. Tras la electroforesis, en geles con proteínas marcadas radiactivamente éstas se fijaron con una solución de acético 5% y metanol

20% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación los geles se secaron empleando un secador de geles Slab Gel Dryer modelo SGD 5040 de Savant (EE.UU) y se expusieron durante al menos 12 horas en una pantalla BAS-MP 2025 (Fujifilm) finalmente se analizaron en un *Fujifilm Fluorescent Image Analyzer* modelo FLA-300R (Tokyo, Japón) usando el programa *Image Gauge 3.12 Science Lab 98* de Fuji Photo Film.

Los geles que no contenían proteínas marcadas radiactivamente fueron teñidos empleando una solución 46% metanol (v/v), 8% ácido acético (v/v), 0.1% Azul de coomasie (p/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para decolorar los geles se emplearon diversos lavados con la solución de fijación descrita anteriormente.

### **Inmunodetección**

Tras la electroforesis de las muestras en geles de poli-acrilamida al 12% las proteínas fueron transferidas (1 hora 20 minutos, 100 V) a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Bioscience). Para la inmunodetección se empleó sistema *ECL advance* de Amersham Bioscience (Little Chalfon, UK) siguiendo las instrucciones del proveedor. El anticuerpo primario se utilizó diluido en una proporción 1:20000 y el secundario 1:30000. La membrana una vez marcada se expuso frente a una película fotográfica Fujifilm durante un tiempo variable según las condiciones del experimento, para luego ser revelada.

### **M.10 PREPARACIÓN DE VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES (LUVs)**

Todos los lípidos utilizados en la elaboración de liposomas fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los lípidos liofilizados se resuspendieron en una solución de cloroformo:metanol (3:1) y mezclados según la proporción molar adecuada (60:40 en el casos de las mezclas de POPC y POPG). La solución orgánica se secó usando un flujo de N<sub>2</sub> para producir una fina película en la pared de un matraz de fondo redondo. A continuación para asegurar un completo secado, las muestras fueron sometidas a vacío empleando un rotavapor durante al menos 30 minutos. Los lípidos se re-hidrataron empleando el volumen necesario de una solución NaCl 20 mM, HEPES 5 mM, ANTS 12.5 mM y DPX 45 mM

## *Materiales y Métodos*

(ajustada al pH adecuado), para obtener una concentración final de lípidos de 7.5 mg/mL. Tras al menos seis ciclos de congelación-descongelación los lípidos se pasaron por un doble filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm empleando dos agujas de extrusión de *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, AL, USA), para finalmente obtener vesículas unilamelares grandes (100 nm). Para eliminar el exceso de sonda fluorescente no encapsulada se pasó la muestra a través de una columna de exclusión molecular Sephacryl S-200 de GE (General Electric Company) previamente equilibrada con tampón C (HEPES 5 mM NaCl 100 mM EDTA 0.1 mM) empleando un sistema de baja presión ÄKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden). La concentración de lípidos en las fracciones seleccionadas tras la cromatografía se estimó empleando el sistema de cuantificación de fosfolípidos *Phospholipid B kit* de Wako (Wako Chemicals GMBH, Neuss, Alemania) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

### **Liberación de contenidos**

Las diferentes cantidades de péptido se añadieron a 1 mL de tampón C en agitación continua con una concentración de LUVs que contenían la pareja ANTS/DPX de 50  $\mu$ M. La fluorescencia se midió a temperatura ambiente en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 530 nm.

El porcentaje de liberación producido por el péptido (R) se obtuvo empleando la siguiente ecuación:

$$R = (F_{ss} - F_0)/(F_{max} - F_0)$$

Donde  $F_{ss}$  es el valor de fluorescencia en el estado estacionario,  $F_0$  es el valor inicial de fluorescencia antes de la adición del péptido (tampón y LUVs) y  $F_{max}$  es el valor máximo de fluorescencia, obtenido tras la adición de Triton X-100 (concentración final 100 mM).

# **BIBLIOGRAFÍA**

Abell BM, Rabu C, Leznicki P, Young JC, High S (2007) Post-translational integration of tail-anchored proteins is facilitated by defined molecular chaperones. *J Cell Sci* **120**(Pt 10): 1743-1751

Ahlquist P, Noueir AO, Lee WM, Kushner DB, Dye BT (2003) Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* **77**(15): 8181-8186

Akiyama Y, Ito K (1993) Folding and assembly of bacterial alkaline phosphatase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **268**(11): 8146-8150

Andersson H, von Heijne G (1993) Position-specific Asp-Lys pairing can affect signal sequence function and membrane protein topology. *J Biol Chem* **268**(28): 21389-21393

Andersson H, von Heijne G (1994) Membrane protein topology: Effects of  $\Delta\mu\text{H}^+$  on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. *EMBO J* **13**(10): 2267-2272

Andrews DW, Walter P, Ottensmeyer FP (1985) Structure of the signal recognition particle by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci Usa* **82**(3): 785-789

Atkins D, Hull R, Wells B, Roberts K, Moore P, Beachy RN (1991) The tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *J Gen Virol* **72**(Pt 1): 209-211

Beachy RN, Heinlein M (2000) Role of P30 in replication and spread of TMV. *Traffic* **1**(7): 540-544.

Behnia R, Munro S (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**(7068): 597-604

Bierzynski A (2001) Methods of peptide conformation studies. *Acta Biochim Pol* **48**(4): 1091-1099

Boevink P, Oparka KJ (2005) Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiol* **138**(4): 1815-1821

## Bibliografia

Bordier C (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* **256**(4): 1604-1607

Boyko V, Ashby JA, Suslova E, Ferralli J, Sterthaus O, Deom CM, Heinlein M (2002) Intramolecular complementing mutations in tobacco mosaic virus movement protein confirm a role for microtubule association in viral RNA transport. *J Virol* **76**(8): 3974-3980

Brill LM, Nunn RS, Kahn TW, Yeager M, Beachy RN (2000) Recombinant tobacco mosaic virus movement protein is an RNA-binding, alpha-helical membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13): 7112-7117

Brockman H (1999) Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr Opin Struct Biol* **9**(4): 438-443

Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ (1996) Plant virus online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th *Plant virus online*

Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ. (1996 onwards) Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.

Bulheller BM, Rodger A, Hirst JD (2007) Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Chem Phys* **9**(17): 2020-2035

Caputo GA, London E (2003a) Cumulative effects of amino acid substitutions and hydrophobic mismatch upon the transmembrane stability and conformation of hydrophobic alpha-helices. *Biochemistry* **42**(11): 3275-3285

Caputo GA, London E (2003b) Using a novel dual fluorescence quenching assay for measurement of tryptophan depth within lipid bilayers to determine hydrophobic alpha-helix locations within membranes. *Biochemistry* **42**(11): 3265-3274

Carrington JC, Morris TJ, Stockley PG, Harrison SC (1987) Structure and assembly of turnip crinkle virus. IV. Analysis of the coat protein gene and implications of the subunit primary structure. *J Mol Biol* **194**(2): 265-276

Citovsky V, Knorr D, Schuster G, Zambryski P (1990) The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* **60**(4): 637-647

Citovsky V, McLean BG, Zupan JR, Zambryski P (1993) Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes Dev* **7**(5): 904-910

Citovsky V, Wong ML, Shaw AL, Prasad BV, Zambryski P (1992) Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* **4**(4): 397-411

Claros MG, von Heijne G (1994) TopPred II: An improved software for membrane protein structure prediction. *CABIOS* **10**: 685-686

Cooper GM (2000) *The Cell: A molecular approach*. 2<sup>a</sup> edición Cap III

Crowley KS, Liao SR, Worrell VE, Reinhart GD, Johnson AE (1994) Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* **78**(3): 461-471

Cserző M, Wallin E, Simon I, von Heijne G, Elofsson A (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* **10**(6): 673-676

Cuthbertson JM, Doyle DA, Sansom MS (2005) Transmembrane helix prediction: a comparative evaluation and analysis. *Protein Eng Des Sel* **18**(6): 295-308

Chamberlain AK, Lee Y, Kim S, Bowie JU (2004) Snorkeling preferences foster an amino acid composition bias in transmembrane helices. *J Mol Biol* **339**(2): 471-479

Chen CP, Kernytsky A, Rost B (2002) Transmembrane helix predictions revisited. *Protein Sci* **11**(12): 2774-2791



## Bibliografia

Chen HF, Kendall DA (1995) Artificial transmembrane segments - Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *J Biol Chem* **270**(23): 14115-14122

Daleke DL (2007) Phospholipid flippases. *J Biol Chem* **282**(2): 821-825

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**(5726): 1321-1323

Das S, Hahn Y, Walker DA, Nagata S, Willingham MC, Peehl DM, Bera TK, Lee B, Pastan I (2008) Topology of NGEF, a prostate-specific cell:cell junction protein widely expressed in many cancers of different grade level. *Cancer Res* **68**(15): 6306-6312

de Gier JW, Luirink J (2001) Biogenesis of inner membrane proteins in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **40**(2): 314-322

de Gier JW, Luirink J (2003) The ribosome and YidC. New insights into the biogenesis of Escherichia coli inner membrane proteins. *EMBO Rep* **4**(10): 939-943.

de Gier JW, Mansournia P, Valent QA, Phillips GJ, Luirink J, von Heijne G (1996) Assembly of a cytoplasmic membrane protein in Escherichia coli is dependent on the signal recognition particle. *FEBS Lett* **399**(3): 307-309

de Planque MR, Killian JA (2003) Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. *Mol Membr Biol* **20**(4): 271-284

Deitermann S, Sprie GS, Koch H-G (2005) A Dual Function for SecA in the Assembly of Single Spanning Membrane Proteins in Escherichia coli. *J Biol Chem* **280**(47): 39077-39085

Delos SE, Gilbert JM, White JM (2000) The central proline of an internal viral fusion peptide serves two important roles. *J Virol* **74**(4): 1686-1693

Denzer AJ, Nabholz CE, Spiess M (1995) Transmembrane orientation of signal-anchor proteins is affected by the folding state but not the size of the N-terminal domain. *EMBO J* **14**(24): 6311-6317

Deom C, Schubert K, Wolf S, Holt C, Lucas W, Beachy R (1990) Molecular Characterization and Biological Function of the Movement Protein of Tobacco Mosaic Virus in Transgenic Plants. *PNAS* **87**(9): 3284-3288

Derman AI, Beckwith J (1991) *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J Bacteriol* **173**(23): 7719-7722

Ding B, Haudenschild JS, Hull RJ, Wolf S, Beachy RN, Lucas WJ (1992) Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **4**(8): 915-928

Do H, Falcone D, Lin J, Andrews DW, Johnson AE (1996) The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell* **85**(3): 369-378

Dobson CM (2004) Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods* **34**(1): 4-14

Drew D, Lerch M, Kunji E, Slotboom DJ, de Gier JW (2006) Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nat Methods* **3**(4): 303-313

Drew D, Sjostrand D, Nilsson J, Urbig T, Chin CN, de Gier JW, von Heijne G (2002) Rapid topology mapping of *Escherichia coli* inner-membrane proteins by prediction and PhoA/GFP fusion analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2690-2695

Drew DE, von Heijne G, Nordlund P, de Gier JW (2001) Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **507**(2): 220-224

## Bibliografia

Drugeon G, Jupin I (2002) Stability in vitro of the 69K movement protein of Turnip yellow mosaic virus is regulated by the ubiquitin-mediated proteasome pathway. *J Gen Virol* **83**(Pt 12): 3187-3197.

Engelman DM (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**(7068): 578-580

Erhardt M, Stussi-Garaud C, Guilley H, Richards KE, Jonard G, Bouzoubaa S (1999) The first triple gene block protein of peanut clump virus localizes to the plasmodesmata during virus infection. *Virology* **264**(1): 220-229

Evans EA, Gilmore R, Blobel G (1986) Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 581-585

Faulkner CR, Blackman LM, Cordwell SJ, Overall RL (2005) Proteomic identification of putative plasmodesmatal proteins from *Chara corallina*. *Proteomics* **5**(11): 2866-2875

Feilmeier BJ, Iseminger G, Schroeder D, Webber H, Phillips GJ (2000) Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**(14): 4068-4076

Ferralli J, Ashby J, Fasler M, Boyko V, Heinlein M (2006) Disruption of microtubule organization and centrosome function by expression of tobacco mosaic virus movement protein. *J Virol* **80**(12): 5807-5821

Fields GB, Noble RL (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Prot Res* **35**: 161-214

Fisher BW, Adams, M. J. Atntoniw, J. F. (2005) Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design. *Protein Reviews* **Vol 1**: 11

Franke C, Matschl U, Bruns M (2007) Enzymatic treatment of duck hepatitis B virus: topology of the surface proteins for virions and noninfectious subviral particles. *Virology* **359**(1): 126-136

Frischmuth S, Kleinow T, Aberle H-J, Wege C, HÄ¼lser D, Jeske H (2004) Yeast two-hybrid systems confirm the membrane- association and oligomerization of BC1 but do not detect an interaction of the movement

proteins BC1 and BV1 of Abutilon mosaic geminivirus. *Archives of Virology* **149**(12): 2349-2364

Fujiki M, Kawakami S, Kim RW, Beachy RN (2006) Domains of tobacco mosaic virus movement protein essential for its membrane association. *J Gen Virol* **87**(Pt 9): 2699-2707

Gafvelin G, Sakaguchi M, Andersson H, von Heijne G (1997) Topological rules for membrane protein assembly in eukaryotic cells. *J Biol Chem* **272**(10): 6119-6127

Garcia-Saez AJ, Mingarro I, Perez-Paya E, Salgado J (2004) Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry* **43**(34): 10930-10943

Genoves A, Navarro JA, Pallas V (2006) Functional analysis of the five melon necrotic spot virus genome-encoded proteins. *J Gen Virol* **87**(Pt 8): 2371-2380

Gillespie T, Boevink P, Haupt S, Roberts AG, Toth R, Valentine T, Chapman S, Oparka KJ (2002) Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**(6): 1207-1222

Goder V, Spiess M (2001) Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Letters* **504**(3): 87-93

Goelet P, Karn J (1982) Tobacco mosaic virus induces the synthesis of a family of 3' coterminal messenger RNAs and their complements. *J Mol Biol* **154**(3): 541-550

Gohlke U, Pullan L, McDevitt CA, Porcelli I, de Leeuw E, Palmer T, Saibil HR, Berks BC (2005) The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30): 10482-10486

Gomara MJ, Mora P, Mingarro I, Nieva JL (2004) Roles of a conserved proline in the internal fusion peptide of Ebola glycoprotein. *FEBS Lett* **569**(1-3): 261-266

## Bibliografia

Görlich D, Hartmann E, Prehn S, Rapoport TA (1992) A Protein of the Endoplasmic Reticulum Involved Early in Polypeptide Translocation. *Nature* **357**(6373): 47-52

Görlich D, Rapoport TA (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **75**(4): 615-630

Gray SM (1996) Plant virus proteins involved in natural vector transmission. *Trends Microbiol* **4**(7): 259-264

Guenoune-Gelbart D, Elbaum M, Sagi G, Levy A, Epel BL (2008) Tobacco mosaic virus (TMV) replicase and movement protein function synergistically in facilitating TMV spread by lateral diffusion in the plasmodesmal desmotubule of *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**(3): 335-345

Gumbart J, Schulten K (2006) Molecular dynamics studies of the archaeal translocon. *Biophys J* **90**(7): 2356-2367

Hacker DL, Petty IT, Wei N, Morris TJ (1992) Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement. *Virology* **186**(1): 1-8

Hagiwara Y, Komoda K, Yamanaka T, Tamai A, Meshi T, Funada R, Tsuchiya T, Naito S, Ishikawa M (2003) Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. *EMBO J* **22**(2): 344-353

Halic M, Beckmann R (2005) The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol* **15**(1): 116-125

Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* **21**(17): 4671-4679

Hanzal-Bayer MF, Hancock JF (2007) Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett* **581**(11): 2098-2104

Haupt S, Cowan GH, Ziegler A, Roberts AG, Oparka KJ, Torrance L (2005) Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway. *Plant Cell* **17**(1): 164-181

Hegde RS, Voigt S, Rapoport TA, Lingappa VR (1998) TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* **92**(5): 621-631

Heinlein M, Padgett HS, Gens JS, Pickard BG, Casper SJ, Epel BL, Beachy RN (1998a) Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* **10**(7): 1107-1120

Heinlein M, Wood MR, Thiel T, Beachy RN (1998b) Targeting and modification of prokaryotic cell-cell junctions by tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *Plant J* **14**(3): 345-351

Heinrich SU, Mothes W, Brunner J, Rapoport TA (2000) The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell* **102**(2): 233-244

Heinrich SU, Rapoport TA (2003) Cooperation of transmembrane segments during the integration of a double-spanning protein into the ER membrane. *Embo J* **22**(14): 3654-3663.

Herranz M, Sanchez-Navarro JA, Sauri A, Mingarro I, Pallas V (2005a) Mutational analysis of the RNA-binding domain of the Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) movement protein reveals its requirement for cell-to-cell movement. *Virology* **339**(1): 31-41

Herranz MC, Pallas V (2004) RNA-binding properties and mapping of the RNA-binding domain from the movement protein of Prunus necrotic ringspot virus. *J Gen Virol* **85**(Pt 3): 761-768.

Herranz MC, Sanchez-Navarro JA, Aparicio F, Pallas V (2005b) Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *J Virol Methods* **124**(1-2): 49-55

## Bibliografia

Hessa T, Kim H, Bihlmaier K, Lundin C, Boekel J, Andersson H, Nilsson I, White SH, von Heijne G (2005a) Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* **433**(7024): 377-381

Hessa T, Meindl-Beinker NM, Bernsel A, Kim H, Sato Y, Lerch-Bader M, Nilsson I, White SH, von Heijne G (2007) Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. *Nature* **450**(7172): 1026-1030

Hessa T, White SH, von Heijne G (2005b) Membrane Insertion of a Potassium-Channel Voltage Sensor. *Science* **307**(5714): 1427-

Higy M, Junne T, Spiess M (2004) Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **43**(40): 12716-12722

Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**(4): 378-379

Hofmann K (1993) A Database of Membrane Spanning Protein Segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **374**: 166

Holland JJ (2006) Transitions in understanding of RNA viruses: a historical perspective. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**: 371-401

Hsu HT, Chou YL, Tseng YH, Lin YH, Lin TM, Lin NS, Hsu YH, Chang BY (2008) Topological properties of the triple gene block protein 2 of Bamboo mosaic virus. *Virology* **379**(1): 1-9

Huang Z (1999) Association of the movement protein of alfalfa mosaic virus with the endoplasmic reticulum and its trafficking in epidermal cells of onion bulb scales. *Mol Plant-Microbe Interac* **12**(8): 680-690

Huber D, Boyd D, Xia Y, Olma MH, Gerstein M, Beckwith J (2005a) Use of thioredoxin as a reporter to identify a subset of Escherichia coli signal sequences that promote signal recognition particle-dependent translocation. *J Bacteriol* **187**(9): 2983-2991

Huber D, Cha MI, Debarbieux L, Planson AG, Cruz N, Lopez G, Tasayco ML, Chaffotte A, Beckwith J (2005b) A selection for mutants that interfere with folding of Escherichia coli thioredoxin-1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(52): 18872-18877

Hull R (2002) *Matthews' Plant Virology*. Academic Press

Igura M, Maita N, Kamishikiryo J, Yamada M, Obita T, Maenaka K, Kohda D (2008) Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase. *EMBO J* **27**(1): 234-243

Imperi F, Putignani L, Tiburzi F, Ambrosi C, Cipollone R, Ascenzi P, Visca P (2008) Membrane-association determinants of the omega-amino acid monooxygenase PvdA, a pyoverdine biosynthetic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **154**(Pt 9): 2804-2813

Ito H, Watanabe S, Sanchez A, Whitt MA, Kawaoka Y (1999) Mutational analysis of the putative fusion domain of Ebola virus glycoprotein. *J Virol* **73**(10): 8907-8912

Jacobs R, White S (1989a) The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: Implications for the insertion of transbilayer helices. *Biochemistry* **28**: 3421-3437

Jacobs RE, White SH (1986) Mixtures of a series of homologous hydrophobic peptides with lipid bilayers: a simple model system for examining the protein-lipid interface. *Biochemistry* **25**(9): 2605-2612

Jacobs RE, White SH (1987) Lipid bilayer perturbations induced by simple hydrophobic peptides. *Biochemistry* **26**(19): 6127-6134

Jacobs RE, White SH (1989b) The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: implications for the insertion of transbilayer helices. *Biochemistry* **28**(8): 3421-3437

Jakubiec A, Jupin I (2007) Regulation of positive-strand RNA virus replication: the emerging role of phosphorylation. *Virus Res* **129**(2): 73-79



## Bibliografija

Jaysinghe S, Hristova K, Wimley W, Snider C, White S.H (2006) Membrane Protein EXplorer. <http://blancobiomoluciedu/mpex>

Jemth P, Gianni S, Day R, Li B, Johnson CM, Daggett V, Fersht AR (2004) Demonstration of a low-energy on-pathway intermediate in a fast-folding protein by kinetics, protein engineering, and simulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6450-6455

Johnson AE, van Waes MA, Heinrich SU, Mothes W, Brunner J, Rapoport TA (1999) The translocon: A dynamic gateway at the ER membrane. The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Annu Rev Cell Develop Biol* **15**(2): 799-842

Joly JC, Swartz JR (1997) In vitro and in vivo redox states of the Escherichia coli periplasmic oxidoreductases DsbA and DsbC. *Biochemistry* **36**(33): 10067-10072

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1994) A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **33**(10): 3038-3049

Juretic D, Lee B, Trinajstic N, Williams RW (1993) Conformational Preference Functions for Predicting Helices in Membrane Proteins. *Biopolymers* **33**(2): 255-273

Kahn TW, Lapidot M, Heinlein M, Reichel C, Cooper B, Gafny R, Beachy RN (1998) Domains of the TMV movement protein involved in subcellular localization. *Plant J* **15**(1): 15-25

Karasev AV, Kashina AS, Gelfand VI, Dolja VV (1992) HSP70-related 65 kDa protein of beet yellows closterovirus is a microtubule-binding protein. *FEBS Lett* **304**(1): 12-14

Kasschau KD, Carrington JC (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**(4): 461-470

Kawakami S, Watanabe Y, Beachy RN (2004) Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(16): 6291-6296

Kelly SM, Jess TJ, Price NC (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* **1751**(2): 119-139

Kelly SM, Price NC (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* **1**(4): 349-384

Kida Y, Sakaguchi M, Fukuda M, Mikoshiba K, Mihara K (2000) Membrane Topogenesis of a Type I Signal-Anchor Protein, Mouse Synaptotagmin II, on the Endoplasmic Reticulum. *J Cell Biol* **150**(4): 719-730

Kiefer D, Kuhn A (1999) Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage Pf3 coat protein without topological control. *Embo J* **18**(22): 6299-6306

Killian JA (1998) Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta* **1376**(3): 401-415

Killian JA (2003) Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. *FEBS Lett* **555**(1): 134-138

Kim H, Melen K, Osterberg M, von Heijne G (2006) A global topology map of the *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(30): 11142-11147

Kiselyova OI, Yaminsky IV, Karger EM, Frolova OY, Dorokhov YL, Atabekov JG (2001) Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein-RNA complexes formed in vitro. *J Gen Virol* **82**(Pt 6): 1503-1508

Kneller EL, Rakotondrafara AM, Miller WA (2006) Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res* **119**(1): 63-75

Kobayashi K, Otegui MS, Krishnakumar S, Mindrinis M, Zambryski P (2007) INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2 encodes a putative DEVH

## Bibliografia

box RNA helicase involved in plasmodesmata function during Arabidopsis embryogenesis. *Plant Cell* **19**(6): 1885-1897

Kobayashi K, Zambryski P (2007) RNA silencing and its cell-to-cell spread during Arabidopsis embryogenesis. *Plant J* **50**(4): 597-604

Kowarik M, Kung S, Martoglio B, Helenius A (2002) Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **10**(4): 769-778.

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**(3): 567-580

Kuma H, Shinde AA, Howren TR, Jennings ML (2002) Topology of the anion exchange protein AE1: the controversial sidedness of lysine 743. *Biochemistry* **41**(10): 3380-3388

Kurata T, Okada K, Wada T (2005) Intercellular movement of transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* **8**(6): 600-605

Kuroiwa T, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T (1991) Systematic analysis of stop-transfer sequence for microsomal membrane. *J Biol Chem* **266**(14): 9251-9255

Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, Fujiwara T (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**: 351-378

Kyte J, Doolittle RF (1982) A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132

Ladokhin AS, White SH (1999) Folding of amphipathic alpha-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin. *J Mol Biol* **285**(4): 1363-1369

Landolt-Marticorena C, Williams KA, Deber CM, Reithmeier RAF (1993) Non-Random Distribution of Amino Acids in the Transmembrane Segments of Human Type-I Single Span Membrane Proteins. *J Mol Biol* **229**(3): 602-608

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948

Lazarowitz SG, Beachy RN (1999) Viral Movement Proteins as Probes for Intracellular and Intercellular Trafficking in Plants. *Plant Cell* **11**(4): 535-548

Lee J-Y, Lucas WJ (2001) Phosphorylation of viral movement proteins - regulation of cell-to-cell trafficking. *Trends in Microbiology* **9**(1): 5-8

Lee JY, Taoka K, Yoo BC, Ben-Nissan G, Kim DJ, Lucas WJ (2005) Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and Arabidopsis recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell* **17**(10): 2817-2831

Lerch-Bader M, Lundin C, Kim H, Nilsson I, von Heijne G (2008) Contribution of positively charged flanking residues to the insertion of transmembrane helices into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(11): 4127-4132

Li H, Chavan M, Schindelin H, Lennarz WJ (2008) Structure of the oligosaccharyl transferase complex at 12 Å resolution. *Structure* **16**(3): 432-440

Li SC, Deber CM (1993) Peptide Environment Specifies Conformation - Helicity of Hydrophobic Segments Compared in Aqueous, Organic, and Membrane Environments. *J Biol Chem* **268**(31): 22975-22978

Li SC, Deber CM (1994) A measure of helical propensity for amino acids in membrane environments. *Nat Struct Biol* **1**(6): 368-373.

Li WZ, Qu F, Morris TJ (1998) Cell-to-cell movement of turnip crinkle virus is controlled by two small open reading frames that function in trans. *Virology* **244**(2): 405-416

## Bibliografia

Liu JZ, Blancaflor EB, Nelson RS (2005) The tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiol* **138**(4): 1853-1865

Lodish HA, Berk, L.S, Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. (2000) Molecular Cell Biology. *Freeman W H 4th Ed*: New York

Loesch-Fries LS, Halk EL, Nelson SE, Krahn KJ (1985) Human leukocyte interferon does not inhibit alfalfa mosaic virus in protoplasts or tobacco tissue. *Virology* **143**(2): 626-629

Lu J, Deutsch C (2001) Pegylation: a method for assessing topological accessibilities in Kv1.3. *Biochemistry* **40**(44): 13288-13301

Lucas WJ (1995) Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Curr Opin Cell Biol* **7**(5): 673-680.

Lukhovitskaya NI, Yelina NE, Zamyatnin AA, Jr., Schepetilnikov MV, Solovyev AG, Sandgren M, Morozov SY, Valkonen JP, Savenkov EI (2005) Expression, localization and effects on virulence of the cysteine-rich 8 kDa protein of Potato mop-top virus. *J Gen Virol* **86**(Pt 10): 2879-2889

MacCallum JL, Bennett WF, Tieleman DP (2008) Distribution of amino acids in a lipid bilayer from computer simulations. *Biophys J* **94**(9): 3393-3404

Mackenzie KR (2006) Folding and stability of alpha-helical integral membrane proteins. *Chem Rev* **106**(5): 1931-1977

Maget-Dana R (1999) The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1462**(1-2): 109-140

Maget-Dana R, Lelievre D, Brack A (1999) Surface active properties of amphiphilic sequential isopeptides: Comparison between alpha-helical and beta-sheet conformations. *Biopolymers* **49**(5): 415-423

Mahmood ur R, Ali I, Husnain T, Riazuddin S (2008) RNA interference: the story of gene silencing in plants and humans. *Biotechnol Adv* **26**(3): 202-209

Mant A, Schmidt I, Herrmann RG, Robinson C, Klösgen RB (1995) Sec-dependent thylakoid protein translocation - Delta pH requirement is dictated by passenger protein and ATP concentration. *J Biol Chem* **270**(40): 23275-23281

Marcos JF, Vilar M, Perez-Paya E, Pallas V (1999) In vivo detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from carnation mottle carmovirus (CarMV). *Virology* **255**(2): 354-365

Martinez-Gil L, Perez-Gil J, Mingarro I (2008) The surfactant peptide KL4 sequence is inserted with a transmembrane orientation into the endoplasmic reticulum membrane. *Biophys J* **95**(6): L36-38

Mas P, Beachy RN (1999) Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J Cell Biol* **147**(5): 945-958

Maule AJ (2008) Plasmodesmata: structure, function and biogenesis. *Curr Opin Plant Biol* **11**(6): 680-686

Maxfield FR, Tabas I (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**(7068): 612-621

McIntosh TJ, Simon SA (2006) Roles of bilayer material properties in function and distribution of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**: 177-198

Melcher U (2000) The '30K' superfamily of viral movement proteins. *J Gen Virol* **81**(Pt 1): 257-266

Melen K, Krogh A, von Heijne G (2003) Reliability measures for membrane protein topology prediction algorithms. *J Mol Biol* **327**(3): 735-744

## Bibliografia

Menetret J-F, Hegde RS, Heinrich SU, Chandramouli P, Ludtke SJ, Rapoport TA, Akey CW (2005) Architecture of the Ribosome-Channel Complex Derived from Native Membranes. *Journal of Molecular Biology* **348**(2): 445-457

Menetret JF, Hegde RS, Aguiar M, Gygi SP, Park E, Rapoport TA, Akey CW (2008) Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome. *Structure* **16**(7): 1126-1137

Miller DJ, Schwartz MD, Dye BT, Ahlquist P (2003) Engineered retargeting of viral RNA replication complexes to an alternative intracellular membrane. *J Virol* **77**(22): 12193-12202

Mingarro I, Nilsson I, Whitley P, von Heijne G (2000) Different conformations of nascent polypeptides during translocation across the ER membrane. *BMC Cell Biol* **1**: 3

Misselwitz B, Staack O, Rapoport TA (1998) J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol Cell* **2**(5): 593-603

Moise AR, Grant JR, Lippe R, Gabathuler R, Jefferies WA (2004) The adenovirus E3-6.7K protein adopts diverse membrane topologies following posttranslational translocation. *J Virol* **78**(1): 454-463

Monne M, Hermansson M, von Heijne G (1999) A turn propensity scale for transmembrane helices. *J Mol Biol* **288**(1): 141-145

Monne M, Nilsson I, Johansson M, Elmhed N, von Heijne G (1998) Positively and negatively charged residues have different effects on the position in the membrane of a model transmembrane helix. *J Mol Biol* **284**(4): 1177-1183

Moreno IM, Thompson JR, Garcia-Arenal F (2004) Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by Cucumber green mottle mosaic virus. *J Gen Virol* **85**(Pt 3): 749-759

Morozov S, Denisenko ON, Zelenina DA, Fedorkin ON, Solovyev AG, Maiss E, Casper R, Atabekov JG (1993) A novel open reading frame in tobacco mosaic virus genome coding for a putative small, positively charged protein. *Biochimie* **75**(8): 659-665

Morozov SY, Solovyev AG (2003) Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *J Gen Virol* **84**(Pt 6): 1351-1366

Mothes W, Prehn S, Rapoport TA (1994) Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J* **13**: 3937-3982

Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H (2000) Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**(5): 533-542

Muller DJ, Wu N, Palczewski K (2008) Vertebrate membrane proteins: structure, function, and insights from biophysical approaches. *Pharmacol Rev* **60**(1): 43-78

Nagy PD, Pogany J (2006) Yeast as a model host to dissect functions of viral and host factors in tombusvirus replication. *Virology* **344**(1): 211-220

Navarro JA, Genoves A, Climent J, Sauri A, Martinez-Gil L, Mingarro I, Pallas V (2006) RNA-binding properties and membrane insertion of Melon necrotic spot virus (MNSV) double gene block movement proteins. *Virology* **356**(1-2): 57-67

Nilsson I, Kelleher DJ, Miao Y, Shao Y, Kreibich G, Gilmore R, Von Heijne G, Johnson AE (2003) Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *J Cell Biol* **161**(4): 715-725.

Nilsson I, Saaf A, Whitley P, Gafvelin G, Waller C, von-Heijne G (1998) Proline-induced disruption of a transmembrane alpha-helix in its natural environment. *J Mol Biol* **284**(4): 1165-1175

Nilsson I, von Heijne G (1993) Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **268**(8): 5798-5801



## Bibliografia

Nilsson I, von Heijne G (2000) Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *Journal of Biological Chemistry* **275**(23): 17338-17343

Nilsson J, Persson B, von Heijne G (2000) Consensus predictions of membrane protein topology. *FEBS Lett* **486**(3): 267-269

Ohshima K, Ando T, Motomura N, Matsuo K, Sako N (2000) Comparative study on genomes of two Japanese melon necrotic spot virus isolates. *Acta Virol* **44**(6): 309-314

Oparka KJ, Prior DA, Santa Cruz S, Padgett HS, Beachy RN (1997) Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *Plant J* **12**(4): 781-789

Oparka KJ, Roberts AG, Boevink P, Santa Cruz S, Roberts I, Pradel KS, Imlau A, Kotlizky G, Sauer N, Epel B (1999) Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* **97**(6): 743-754.

Osborne AR, Rapoport TA (2007) Protein translocation is mediated by oligomers of the SecY complex with one SecY copy forming the channel. *Cell* **129**(1): 97-110

Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**(1): 529-550

Peremyslov VV, Pan Y-W, Dolja VV (2004a) Movement Protein of a Closterovirus Is a Type III Integral Transmembrane Protein Localized to the Endoplasmic Reticulum. *J Virol* **78**(7): 3704-3709

Peremyslov VV, Pan YW, Dolja VV (2004b) Movement protein of a closterovirus is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J Virol* **78**(7): 3704-3709

Perez-Gil J, Nag K, Taneva S, Keough KM (1992) Pulmonary surfactant protein SP-C causes packing rearrangements of

dipalmitoylphosphatidylcholine in spread monolayers. *Biophys J* **63**(1): 197-204

Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7029-7036

Plasencia I, Rivas L, Casals C, Keough KM, Perez-Gil J (2001) Intrinsic structural differences in the N-terminal segment of pulmonary surfactant protein SP-C from different species. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **129**(1): 129-139

Plath K, Mothes W, Wilkinson BM, Stirling CJ, Rapoport TA (1998) Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* **94**(6): 795-807

Polverino de Laureto P, Scaramella E, Frigo M, Wondrich FG, De Filippis V, Zambonin M, Fontana A (1999) Limited proteolysis of bovine alpha-lactalbumin: isolation and characterization of protein domains. *Protein Sci* **8**(11): 2290-2303

Popot JL, Engelman DM (1990) Membrane protein folding and oligomerization - The 2-stage model. *Biochemistry* **29**(17): 4031-4037

Pouwels J, Van Der Krogt GNM, Van Lent J, Bisseling T, Wellink J (2002) The Cytoskeleton and the Secretory Pathway Are Not Involved in Targeting the Cowpea Mosaic Virus Movement Protein to the Cell Periphery. *Virology* **297**(1): 48-56

Punta M, Forrest LR, Bigelow H, Kernytsky A, Liu J, Rost B (2007) Membrane protein prediction methods. *Methods* **41**(4): 460-474

Rabu C, High S (2007) Membrane protein chaperones: a new twist in the tail? *Curr Biol* **17**(12): R472-474

Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**(7170): 663-669

## Bibliografia

Rapp M, Drew D, Daley DO, Nilsson J, Carvalho T, Melen K, De Gier JW, Von Heijne G (2004) Experimentally based topology models for E. coli inner membrane proteins. *Protein Sci* **13**(4): 937-945

Rapp M, Granseth E, Seppala S, von Heijne G (2006) Identification and evolution of dual-topology membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol* **13**(2): 112-116

Rapp M, Seppala S, Granseth E, von Heijne G (2007) Emulating membrane protein evolution by rational design. *Science* **315**(5816): 1282-1284

Reichel C, Beachy RN (1998) Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19): 11169-11174

Reichel C, Beachy RN (2000) Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J Virol* **74**(7): 3330-3337

Reichel C, Mas P, Beachy RN (1999) The role of the ER and cytoskeleton in plant viral trafficking. *Trends Plant Sci* **4**(11): 458-462.

Rinne PL, van den Boogaard R, Mensink MG, Kopperud C, Kormelink R, Goldbach R, van der Schoot C (2005) Tobacco plants respond to the constitutive expression of the tospovirus movement protein NS(M) with a heat-reversible sealing of plasmodesmata that impairs development. *Plant J* **43**(5): 688-707

Riviere CJ, Rochon DM (1990) Nucleotide sequence and genomic organization of melon necrotic spot virus. *J Gen Virol* **71** ( Pt 9): 1887-1896

Robinson C, Bolhuis A (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 135-147

Rost B, Fariselli P, Casadio R (1996) Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* **5**(8): 1704-1718

Saaf A, Wallin E, von Heijne G (1998) Stop-transfer function of pseudo-random amino acid segments during translocation across prokaryotic and eukaryotic membranes. *Eur J Biochem* **251**(3): 821-829

Sadlish H, Pitonzo D, Johnson AE, Skach WR (2005) Sequential triage of transmembrane segments by Sec61alpha during biogenesis of a native multispanning membrane protein. *Nat Struct Mol Biol* **12**(10): 870-878

Salonen A, Ahola T, Kaariainen L (2005) Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**: 139-173.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.*, Cold Spring Harbour, N.Y.: Cold Spring Harbour Laboratory.

Sanchez-Navarro J, Miglino R, Ragozzino A, Bol JF (2001) Engineering of alfalfa mosaic virus RNA 3 into an expression vector. *Arch Virol* **146**(5): 923-939

Sanchez-Navarro JA, Bol JF (2001) Role of the alfalfa mosaic virus movement protein and coat protein in virus transport. *Mol Plant Microbe Interact* **14**(9): 1051-1062.

Sanchez-Navarro JA, Carmen Herranz M, Pallas V (2006) Cell-to-cell movement of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of Ilar-, bromo-, cucumo-, tobamo- and comoviruses and does not require virion formation. *Virology* **346**(1): 66-73

Sanchez-Navarro JA, Reusken CB, Bol JF, Pallas V (1997) Replication of alfalfa mosaic virus RNA 3 with movement and coat protein genes replaced by corresponding genes of Prunus necrotic ringspot ilarvirus. *J Gen Virol* **78**(Pt 12): 3171-3176

Sauri A, McCormick PJ, Johnson AE, Mingarro I (2007) Sec61alpha and TRAM are sequentially adjacent to a nascent viral membrane protein during its ER integration. *J Mol Biol* **366**(2): 366-374

Sauri A, Saksena S, Salgado J, Johnson AE, Mingarro I (2005) Double-spanning plant viral movement protein integration into the ER membrane is SRP-dependent, translocon-mediated, and concerted. *J Biol Chem*: M412476200

## Bibliografia

Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC (1997) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *Embo J* **16**(13): 4049-4059.

Schneider R, Toulmay A (2007) The role of lipids in the biogenesis of integral membrane proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**(6): 1224-1232

Serek J, Bauer-Manz G, Struhalla G, van den Berg L, Kiefer D, Dalbey R, Kuhn A (2004) Escherichia coli YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J* **23**(2): 294-301

Serrano AG, Cabre EJ, Perez-Gil J (2007) Identification of a segment in the precursor of pulmonary surfactant protein SP-B, potentially involved in pH-dependent membrane assembly of the protein. *Biochim Biophys Acta* **1768**(5): 1059-1069

Serrano AG, Ryan M, Weaver TE, Perez-Gil J (2006) Critical Structure-Function Determinants within the N-Terminal Region of Pulmonary Surfactant Protein SP-B. *Biophys J* **90**(1): 238-249

Shaw JG (1999) Tobacco mosaic virus and the study of early events in virus infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**(1383): 603-611.

Shelness GS, Lin LJ, Nicchitta CV (1993) Membrane Topology and Biogenesis of Eukaryotic Signal Peptidase. *J Biol Chem* **268**(7): 5201-5208

Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**(23): 720-731

Skach WR (2007) The expanding role of the ER translocon in membrane protein folding. *J Cell Biol* **179**(7): 1333-1335

Smolarsky M, Teitelbaum D, Sela M, Gitler C (1977) A simple fluorescent method to determine complement-mediated liposome immune lysis. *J Immunol Methods* **15**(3): 255-265

Soekarjo M, Eisenhawer M, Kuhn A, Vogel H (1996) Thermodynamics of the membrane insertion process of the M13 procoat protein, a lipid bilayer

traversing protein containing a leader sequence. *Biochemistry* **35**(4): 1232-1241

Sokolova M, Prufer D, Tacke E, Rohde W (1997) The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett* **400**(2): 201-205

Sreerama N, Woody RW (2004a) Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol* **383**: 318-351

Sreerama N, Woody RW (2004b) On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Sci* **13**(1): 100-112

Stewart RS, Drisaldi B, Harris DA (2001) A transmembrane form of the prion protein contains an uncleaved signal peptide and is retained in the endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell* **12**(4): 881-889

Szecs J (1999) Development of Tobacco Mosaic virus infection sites in nicotiana benthamiana. *Molec Plant Microb Interactions* **12**(2): 143-152

Szyrach G, Ott M, Bonnefoy N, Neupert W, Herrmann JM (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J* **22**(24): 6448-6457

Taylor JW (1990) Peptide models of dynorphin A(1-17) incorporating minimally homologous substitutes for the potential amphiphilic beta strand in residues 7-15. *Biochemistry* **29**(22): 5364-5373

Taylor PD, Attwood TK, Flower DR (2003) BPROMPT: A consensus server for membrane protein prediction. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3698-3700

Thomas CL, Bayer EM, Ritzenthaler C, Fernandez-Calvino L, Maule AJ (2008) Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol* **6**(1): e7

Trutnyeva K, Bachmaier R, Waigmann E (2005) Mimicking carboxyterminal phosphorylation differentially effects subcellular distribution and cell-to-cell

## Bibliografía

movement of Tobacco mosaic virus movement protein. *Virology* **332**(2): 563-577

Tusnady GE, Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**(9): 849-850

Van den Berg B, Clemons WM, Jr., Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**(6969): 36-44. Epub 2003 Dec 2003.

van der Laan M, Houben EN, Nouwen N, Luirink J, Driessen AJ (2001) Reconstitution of Sec-dependent membrane protein insertion: nascent FtsQ interacts with YidC in a SecYEG-dependent manner. *EMBO Rep* **2**(6): 519-523.

van der Vossen EA, Notenboom T, Bol JF (1995) Characterization of sequences controlling the synthesis of alfalfa mosaic virus subgenomic RNA in vivo. *Virology* **212**(2): 663-672

van Klompenburg W, Nilsson IM, von Heijne G, de Kruijff B (1997) Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *EMBO J* **16**(14): 4261-4266

van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(2): 112-124

Verchot-Lubicz J (2005) A new cell-to-cell transport model for Potexviruses. *Mol Plant Microbe Interact* **18**(4): 283-290

Vilar M, Esteve V, Pallas V, Marcos JF, Perez-Paya E (2001) Structural Properties of Carnation Mottle Virus p7 Movement Protein and Its RNA-binding Domain. *J Biol Chem* **276**(21): 18122-18129

Vilar M, Sauri A, Marcos JF, Mingarro I, Perez-Paya E (2005) Transient structural ordering of the RNA-binding domain of carnation mottle virus p7 movement protein modulates nucleic acid binding. *Chembiochem* **6**(8): 1391-1396

Vilar M, Sauri A, Monne M, Marcos JF, von Heijne G, Perez-Paya E, Mingarro I (2002) Insertion and topology of a plant viral movement protein in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **277**(26): 23447-23452.

Vogler H, Kwon MO, Dang V, Sambade A, Fasler M, Ashby J, Heinlein M (2008) Tobacco mosaic virus movement protein enhances the spread of RNA silencing. *PLoS Pathog* **4**(4): e1000038

Voigt S, Jungnickel B, Hartmann E, Rapoport T (1996) Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**(1): 25-35

von Heijne G (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J* **5**: 3021-3027

von Heijne G (1989) Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **341**(6241): 456-458

von Heijne G, Gavel Y (1988) Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem* **174**(4): 671-678

Waigmann E (2004) The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Crit Rev Plant Sci* **23**: 195-250

Waigmann E, Chen MH, Bachmaier R, Ghoshroy S, Citovsky V (2000) Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *Embo J* **19**(18): 4875-4884.

Waigmann E, Lucas WJ, Citovsky V, Zambryski P (1994) Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1433-1437

Waldo GS (2003) Improving protein folding efficiency by directed evolution using the GFP folding reporter. *Methods Mol Biol* **230**: 343-359



## Bibliografia

Walter P, Blobel G (1981a) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* **91**(2 Pt 1): 557-561

Walter P, Blobel G (1981b) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* **91**(2 Pt 1): 551-556

Walter P, Ibrahimi I, Blobel G (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* **91**(2 Pt 1): 545-550

Wang J, Simon AE (1997) Analysis of the two subgenomic RNA promoters for turnip crinkle virus in vivo and in vitro. *Virology* **232**(1): 174-186

White JM, Delos SE, Brecher M, Schornberg K (2008) Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**(3): 189-219

White KA, Skuzeski JM, Li W, Wei N, Morris TJ (1995) Immunodetection, expression strategy and complementation of turnip crinkle virus p28 and p88 replication components. *Virology* **211**(2): 525-534

White SH, von Heijne G (2008) How translocons select transmembrane helices. *Annu Rev Biophys* **37**: 23-42

Whitley P, Grahn E, Kutay U, Rapoport T, von Heijne G (1996) A 12 residues long poly-leucine tail is sufficient to anchor syntaptobrevin to the ER membrane. *J Biol Chem* **271**: 7583-7586

Whitmore L, Wallace BA (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**(5): 392-400

Wickner W, Schekman R (2005) Protein translocation across biological membranes. *Science* **310**(5753): 1452-1456

Wimley WC, Creamer TP, White SH (1996) Solvation energies of amino acid side chains and backbone in a family of host-guest pentapeptides. *Biochemistry* **35**(16): 5109-5124

Wimley WC, White SH (1996a) Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nature Struct Biology* **3**(10): 842-848

Wimley WC, White SH (1996b) Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol* **3**(10): 842-848

Wobbe KK, Akgoz M, Dempsey DMA, Klessig DF (1998) A Single Amino Acid Change in Turnip Crinkle Virus Movement Protein p8 Affects RNA Binding and Virulence on *Arabidopsis thaliana*. *J Virol* **72**(7): 6247-6250

Wolf S, Deom CM, Beachy RN, Lucas WJ (1989) Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* **246**: 377-379

Woolhead CA, Thompson SJ, Moore M, Tissier C, Mant A, Rodger A, Henry R, Robinson C (2001) Distinct Albino3-dependent and -independent pathways for thylakoid membrane protein insertion. *J Biol Chem* **276**(44): 40841-40846

Wright KM, Wood NT, Roberts AG, Chapman S, Boevink P, Mackenzie KM, Oparka KJ (2007) Targeting of TMV movement protein to plasmodesmata requires the actin/ER network: evidence from FRAP. *Traffic* **8**(1): 21-31

Yang Y, Ding B, Baulcombe DC, Verchot J (2000) Cell-to-cell movement of the 25K protein of potato virus X is regulated by three other viral proteins. *Mol Plant Microbe Interact* **13**(6): 599-605.

Zamyatnin AA, Jr., Solovyev AG, Savenkov EI, Germundsson A, Sandgren M, Valkonen JP, Morozov SY (2004) Transient coexpression of individual genes encoded by the triple gene block of potato mop-top virus reveals requirements for TGBp1 trafficking. *Mol Plant Microbe Interact* **17**(8): 921-930

Zhang SC, Zhang G, Yang L, Chisholm J, Sanfacon H (2005) Evidence that insertion of Tomato ringspot nepovirus NTB-VPg protein in endoplasmic

### *Bibliografia*

reticulum membranes is directed by two domains: a C-terminal transmembrane helix and an N-terminal amphipathic helix. *J Virol* **79**(18): 11752-11765

Zimmer J, Nam Y, Rapoport TA (2008) Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature* **455**(7215): 936-943

Zsila F, Bikadi Z, Fitos I, Simonyi M (2004) Probing protein binding sites by circular dichroism spectroscopy. *Curr Drug Discov Technol* **1**(2): 133-153