



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

Doctorado en Biotecnología  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
ERI Biotecnología y Biomedicina

Estudio de la proteína de membrana  
de *Saccharomyces cerevisiae* Rot1:  
Importancia de su dominio  
transmembrana

Carlos Andrés Martínez Garay  
Tesis Doctoral 2016

Directores: Dra. Carmen Bañó Aracil  
Dr. Ismael Mingarro Muñoz





VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Doctorado en Biotecnología  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
ERI Biotecnología y Biomedicina

Estudio de la proteína de membrana  
de *Saccharomyces cerevisiae* Rot1:  
Importancia de su dominio  
transmembrana

Memoria presentada por Carlos Andrés Martínez Garay  
Para optar al grado de Doctor por la Universitat de València

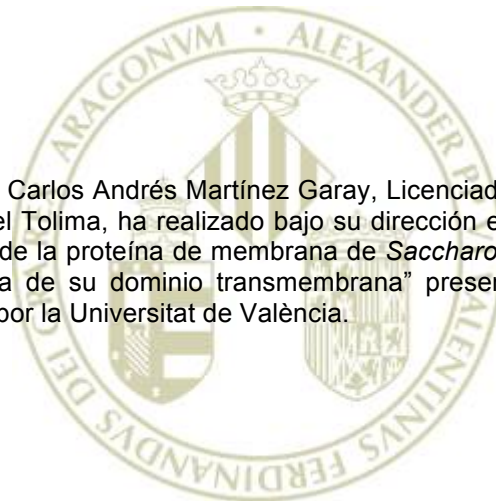
Directores: Dra. Carmen Bañó Aracil  
Dr. Ismael Mingarro Muñoz



CARMEN BAÑÓ ARACIL, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València e

ISMAEL MINGARRO MUÑOZ, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València

INFORMAN: que Carlos Andrés Martínez Garay, Licenciado en Biología por la Universidad del Tolima, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título "Estudio de la proteína de membrana de *Saccharomyces cerevisiae* Rot1: Importancia de su dominio transmembrana" presenta para optar al grado de Doctor por la Universitat de València.



Burjassot, Diciembre de 2015

Dra. Carmen Bañó Aracil

Dr. Ismael Mingarro Muñoz



*A mi familia*





# Agradecimientos

Esta Tesis no podría haberse realizado sin la participación y colaboración de un grupo de gente de gran calidad humana y científica, a los que expreso mi mayor gratitud.

A Carmen Baño, pilar básico de este trabajo, por su dedicación, su comprensión y su conocimiento, cumpliendo un papel conmigo más allá de el de directora de una tesis.

A Ismael Mingarro, por su constante guía, por compartir toda su experiencia, siempre aportándome para mejorar en todos los aspectos.

A Juan Carlos Igual, por enseñarme a pensar críticamente, a hacer ciencia de verdad, y porque sin sus consejos este trabajo no hubiera sido lo mismo.

A todos los integrantes del grupo de Ciclo Celular, que han participado activamente este trabajo. A Ester, Salva y Sara, por traer alegría al laboratorio y por toda la ayuda que me han prestado. A María, por ser la que me enseñó todo sobre levaduras en el laboratorio y por ser una de las mejores personas que he conocido de todos los tiempos. Y a Inma, porque sin ella claramente no existiría esta Tesis ni hubiera sido tan gratificante mi estancia en Valencia; como cualquier cosa que escriba de ella es insuficiente para describir su importancia, solo puedo decir Inma ¡gracias!

A los miembros del grupo de Proteínas de Membrana, por la colaboración prestada en la realización de los experimentos en los que necesite de su ayuda. A

Carlos Baeza por que con su amistad y forma de ser hace más llevadero el estrés del día a día. A Manolo porque aportó enormemente en esta etapa en todos los frentes posibles: como colega en el trabajo, como un buen amigo, como compañero de piso, etc. Un gran descubrimiento.

A Ernest (presidente del COFS) por contagiar de esa energía y alegría que siempre trae consigo cualquier sitio en el que se encuentre.

A Paco Estruch y Marcel.li del Olmo, del laboratorio de Regulación de la Expresión Genica, que siempre han sido un apoyo para nuestro grupo. A Natalia, por ser una de las mejores personas con las que compartí realizando esta Tesis y por estar involucrada e interesada en mi trabajo, contando con ella siempre que fuera necesario. A Mercè, porque su amistad, muy valiosa, me ayudo a sacar adelante muchas cosas. Aunque lo más importante es que siempre estaba dispuesta a empezar una buena conversación sobre series, libros, el Barça, etc., acompañados de una cerveza.

A Raquel, porque sin ella tampoco hubiera podido llegar hasta aquí. Siempre estuvo disponible cuando la necesite, escuchándome, ofreciéndome su amistad desinteresada y enseñándome sobre muchas cosas. Además por adoptarme en muchas ocasiones, haciéndome sentir como parte de su familia.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular por toda la colaboración que me prestaron.

A Sergi Puig, Anto y Adriana, del laboratorio 309 del IATA, porque me ayudaron bastante para finalizar este trabajo, mejorando mi formación. Además por permitirme conocer dos buenas amigas que alegran cualquier jornada en el laboratorio.

Finalmente, pero no menos importantes, todos aquellos que a pesar de estar separados geográficamente, contribuyeron en este trabajo. Danny, Marcela, Juan Camilo, Carito, Aleida y en especial a dos personas Alba Rocío, por ser la persona a la que acudir, ya sea para pedirle consejo, para hablar de la última película o para decidir cual es la mejor opción y a Tatiana por su constante apoyo desde el principio de mi formación.

# Índice

---

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>3</b>
Membranas celulares.....	4
Estructura secundaria de las proteínas de membrana .....	6
Asociación de las proteínas de membrana a la bicapa lipídica .....	7
Mecanismos de inserción/translocación de las proteínas en la membrana del retículo endoplásmico .....	8
Translocación/inserción a través del mecanismo cotraduccional.....	9
Translocación/inserción a través del mecanismo postraduccional.....	11
Estructura del translocón .....	13
El complejo Sec61 .....	13
La subunidad $\alpha$ del complejo Sec.....	15
La subunidad $\beta$ del complejo Sec.....	15
La subunidad $\gamma$ del complejo Sec .....	16
Topología de las proteínas integrales de membrana.....	17
Principales características de las hélices $\alpha$ de las proteínas de membrana.....	20
Tamaño de las hélices $\alpha$ .....	20
Composición de aminoácidos.....	21
Posición de los aminoácidos en los segmentos transmembrana .....	23
Helicidad .....	25

Fuerzas implicadas en el plegamiento de las proteínas de membrana .....	25
Glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico.....	28
Degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico .....	30
Uso de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo para estudios bioquímicos y moleculares.....	34
Rot1, una proteína de membrana de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	35
<b>Objetivos .....</b>	<b>39</b>
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>41</b>
Técnicas empleadas en <i>Escherichia coli</i> .....	41
Cepas y condiciones de crecimiento.....	41
Transformación de células .....	42
Construcción de plásmidos .....	42
a. Construcción del plásmido <i>pTOXR-(ROT1 237-256)-MBP</i> .....	42
b. Construcción del plásmido <i>pGEM-ROT1 237-256</i> .....	43
Mutagénesis dirigida .....	43
Ensayo ToxCAT .....	44
Expresión <i>in vitro</i> de proteínas.....	44
Técnicas empleadas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	45
Cepas de <i>S. cerevisiae</i> .....	45
Condiciones de crecimiento .....	45
Transformación de levaduras.....	49
Construcción de los plásmidos <i>pROT1-3HA-CEN</i> y <i>pGAL1:ROT1-3HA</i> . ...	49
Extractos de proteína total y <i>western blot</i> .....	50
Fraccionamiento subcelular .....	51
Tratamiento con Endoglicosidasa H .....	52
Purificación por afinidad en tándem (TAP) .....	52
Coinmunoprecipitación con <i>Dynabeads Protein G</i> .....	54
Coinmunoprecipitación con perlas de sefarosa .....	54
Entrecruzamiento .....	55
Inmunofluorescencia indirecta .....	55
Análisis informático de la secuencia de Rot1 .....	56

---

<b>3. Estudio del dominio transmembrana de la proteína Rot1 ...</b>	<b>57</b>
Inserción de la proteína Rot1 en la membrana del retículo endoplásmico .....	57
Estrategia para el análisis <i>in vivo</i> de la proteína Rot1 .....	62
Análisis del dominio transmembrana de la proteína Rot1 a través de inserciones de alaninas .....	64
Identificación de los residuos esenciales del dominio transmembrana de la proteína Rot1 a través de sustituciones por leucina .....	69
Análisis del papel del grupo funcional de la cadena lateral del residuo Ser250 en el dominio transmembrana de Rot1 .....	74
Análisis de la posición del residuo Ser250 dentro del fragmento transmembrana de la proteína Rot1 .....	78
Análisis de secuencias homólogas del fragmento transmembrana de la proteína Rot1 .....	80
Influencia del esqueleto transmembrana de la proteína Rot1 en el papel del residuo Ser250 .....	82
<b>4. Señalización de la proteína Rot1 al retículo endoplásmico.</b>	<b>85</b>
Estudio del papel del extremo N-terminal de la proteína Rot1 en la señalización al retículo endoplásmico .....	86
Estudio del papel del extremo C-terminal de la proteína Rot1 en la señalización al retículo endoplásmico .....	89
Estudio del papel de las regiones internas de la proteína Rot1 en la señalización al retículo endoplásmico .....	92
Asociación de las formas truncadas de la proteína Rot1 a la membrana del retículo endoplásmico .....	96
<b>5. Estudio de la ruta de degradación de la proteína Rot1 .....</b>	<b>99</b>
Implicación de las enzimas E2 del sistema ERAD en la degradación de la proteína Rot1 .....	100
Implicación de las enzimas E3 del sistema ERAD en la degradación de la proteína Rot1 .....	104
Identificación de posibles regiones de la proteína Rot1 implicadas en su degradación .....	107
<b>6. Búsqueda de proteínas que interaccionen con Rot1 .....</b>	<b>109</b>
Estudio de la capacidad de homo-dimerización del dominio transmembrana de la proteína Rot1 .....	110
Estudio de la capacidad de homo-dimerización de la proteína Rot1 en levadura .....	113

Análisis de la interacción de Rot1 con otras proteínas mediante ensayos de entrecruzamiento.....	114
Análisis proteómico de las posibles interacciones de Rot1.....	116
Estudio de la interacción de la proteína Rot1 con Def1.....	124
Estudio de la interacción de Rot1 con la chaperona Kar2.....	130
Interacción de la proteína Rot1 con la proteína del complejo de secreción Sec62.....	132
<b>7. Discusión.....</b>	<b>135</b>
El residuo Ser250 del dominio transmembrana de Rot1 es esencial para la viabilidad celular.....	136
Direccionamiento de la proteína Rot1 al retículo endoplásmico.....	141
Degradación de la proteína Rot1.....	144
Interacciones de la proteína de membrana Rot1.....	145
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>151</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>153</b>
<b>10. Anexos.....</b>	<b>165</b>

## Abreviaturas

ATP:	Trifosfato de adenosina
CoIP	Coinmunoprecipitación
Ct	C-terminal
DAPI	Diclorohidrato de 4' 6'-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	1,4-ditioeritrol
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
EGS	Ester etilenglicol disuccinato bis(sulfo-N-succinimidil)
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplásmico
GpA:	Glicoforina A
HA	Hemaglutinina
HR:	Región hidrofóbica
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Lep:	Peptidasa líder
MP:	Proteína de membrana
Nt	N-terminal
OST	Oligosacaril transferasa
PBS	Tampón salino fosfato
RE:	Retículo endoplásmico
RM:	Microsomas rugosos
SDS-PAGE:	Electroforésis en geles de sodio dodecil sulfato- poliacrilamida
SR:	Receptor de la partícula de reconocimiento de la secuencia señal
SRP:	Partícula de reconocimiento de la secuencia señal
SS:	Secuencia señal
TAP	Purificación por afinidad en tándem
TM:	Transmembrana

*Abreviaturas*

---

Aminoácidos, códigos de una y tres letras

Cualquier aminoácido	- Xaa	- X	Isoleucina	- Ile	- I
Ácido aspártico	- Asp	- D	Leucina	- Leu	- L
Ácido glutámico	- Glu	- E	Lisina	- Lys	- K
Alanina	- Ala	- A	Metionina	- Met	- M
Arginina	- Arg	- R	Prolina	- Pro	- P
Asparagina	- Asn	- N	Serina	- Ser	- S
Cisteina	- Cys	- C	Tirosina	- Tyr	- Y
Fenilalanina	- Phe	- F	Treonina	- Thr	- T
Glicina	- Gly	- G	Triptófano	- Trp	- W
Glutamina	- Gln	- Q	Valina	- Val	- V
Histidina	- His	- H			



# 1. Introducción

---

Las proteínas de membrana, aquellas que se hallan embebidas en las membranas biológicas, representan una importante fracción del proteoma de los organismos puesto que al menos un 30% de los genes codifican para este tipo de proteínas (Engel & Gaub 2008). Estas proteínas son además esenciales para el desarrollo de la vida ya que se encuentran implicadas en una amplia variedad de funciones celulares como el mantenimiento de la estructura celular, la comunicación intercelular, diversas reacciones enzimáticas, el transporte de moléculas necesarias para el metabolismo de la célula y la comunicación entre el exterior y el medio intracelular. Vale la pena destacar que parte de la investigación farmacéutica actual está dirigida a emplear las proteínas de membrana como dianas terapéuticas o como parte importante de los mecanismos de reconocimiento de virus, bacterias, parásitos, etc. Sin embargo, a pesar de su importancia y su abundancia, existe aún un notable desconocimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan su funcionamiento, debido principalmente a su naturaleza hidrofóbica, su intrincada estructura y a que forman parte de complejos proteicos más grandes, que hace complicada su

purificación y estudio. Por lo tanto cualquier investigación básica o aplicada enfocada a la caracterización estructural y/o funcional de las proteínas de membrana es clave para la comprensión de los sistemas biológicos.

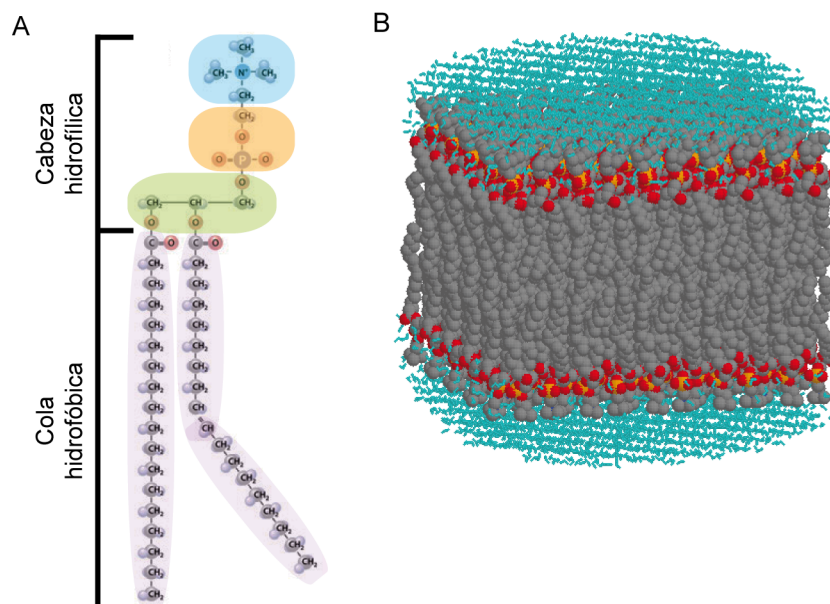
### **Membranas celulares**

La membrana plasmática es una estructura formada por fosfolípidos organizados en una doble capa, que se encargan de delimitar y definir las células; en el caso de los organismos eucariotas, los diferentes organelos que se encuentran dentro de éstos, también están rodeados por membranas lipídicas. Dentro de la bicapa lipídica se encuentran embebidas diferentes tipos de moléculas, como carbohidratos y proteínas.

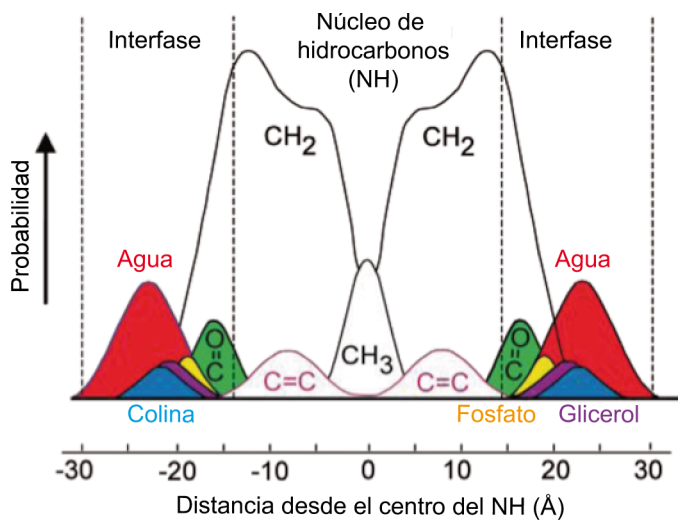
Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas formadas por una cola de hidrocarburos de carácter hidrofóbico y una cabeza con un grupo fosfato hidrofílico (Figura 1.1A). Debido a la anfipaticidad de los fosfolípidos el efecto hidrofóbico dirige su organización mediante la formación de bicapas, que consisten en dos láminas dinámicas de lípidos con las colas hidrofóbicas enfrentadas entre sí (Figura 1.1B). La cabeza hidrofílica cubre las colas hidrofóbicas formando una interfase entre el centro hidrofóbico de la membrana y el ambiente acuoso que la rodea (Granseth *et al.* 2005). Medidas realizadas en una bicapa lipídica purificada formada por DOPC (fosfatidilcolina) han determinado que el centro hidrofóbico mide alrededor de 30 Å, mientras que la región interfacial alrededor tiene un espesor de 15 Å a ambos lados del núcleo hidrofóbico (Wiener & White 1992) (Figura 1.2).

Las colas de los lípidos pueden variar en su longitud, al igual que el tamaño y la carga eléctrica de los grupos polares. La presencia en la membrana de lípidos como el colesterol pueden agregar rigidez y estabilidad a la membrana (Nelson *et al.* 2008). Las diferentes características de las membranas lipídicas, tales como el espesor, la fluidez, curvatura, presión, etc, variarán dependiendo de la composición de fosfolípidos (van Meer *et al.* 2008), lo cual demuestra que existe una gran

variedad entre las membranas biológicas, no solo entre organismos sino también entre organelos dentro de una misma célula, e incluso entre las dos monocapas de una misma membrana.



**Figura 1.1 Estructura y composición de los fosfolípidos y la membrana lipídica.** **A.** Representación del fosfolípido fosfatidilcolina como ejemplo. Una molécula de fosfolípido se compone de dos grandes regiones, una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. La región hidrofílica está compuesta de una colina, en este ejemplo específico (zona azul) y un grupo fosfato (zona naranja). La cabeza polar está conectada a un glicerol (zona verde) y a dos colas hidrofóbicas denominadas ácidos grasos (zona púrpura). **B.** Un esquema de la bicapa fosfolipídica en presencia de un medio acuoso. En azul se muestran las moléculas de agua, en naranja y rojo la región hidrofílica y en gris las colas hidrofóbicas. (Adaptado de <http://www.nature.com/scitable/>)

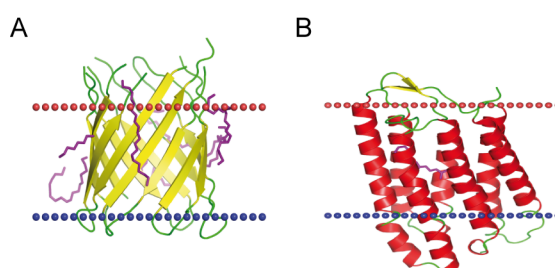


**Figura 1.2. Fosfolípidos y la membrana lipídica.** La probabilidad de localizar cada uno de los grupos químicos que conforman la bicapa lipídica a una distancia dada del centro del núcleo hidrofóbico, determinada en una membrana lipídica formada el fosfolípido DOPC (1,2-dioleoil-glicerol-3-fosfolina). (Adaptado de White & Wimley, 1999)

### Estructura secundaria de las proteínas de membrana

Las proteínas de membrana se caracterizan por poseer en su estructura dominios transmembrana, secuencias de polipéptidos adaptadas para insertarse, plegarse y funcionar en el ambiente complejo de las membranas celulares (Figura 1.2). La naturaleza hidrofóbica que se encuentra en el interior de la bicapa lipídica es el principal factor que conduce a que las proteínas de membranas adopten una estructura secundaria determinada. Los puentes de hidrógeno que se forman entre el nitrógeno del grupo amida y el carbono del grupo carboxilo del esqueleto peptídico permiten un arreglo estructural termodinámicamente más compatible con la membrana lipídica que lo rodea. Basadas en la estructura que adoptan, las proteínas de membrana pueden clasificarse en dos

grandes superfamilias, hoja plegada  $\beta$  y hélice  $\alpha$  (Figura 1.3). Las proteínas de membrana conformadas por hojas  $\beta$  son las menos abundantes, encontrándose en la membrana externa de bacterias, mitocondrias y cloroplastos y constituyen 1-3% del proteoma de los procariontes (Wimley 2003), mientras que las proteínas en hélice  $\alpha$  son el motivo más común en los organismos eucariotas, representando un 20-30% de todos los genes anotados que codifican para proteínas de membranas (Krogh *et al.* 2001). Estas últimas además de ser las más abundantes son el objeto de estudio de la presente tesis, por lo que la información aquí mostrada se enfocará especialmente en las proteínas conformadas en hélices  $\alpha$ .

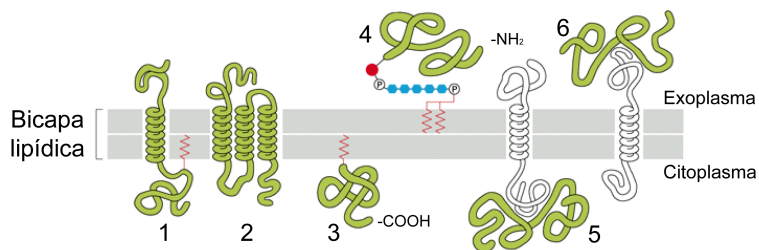


**Figura 1.3. Tipos de proteína de membrana de acuerdo a su estructura secundaria.** **A.** Proteína en barril  $\beta$ , porina específica de oligogalacturonato (código PDB 4FQE). **B.** Proteína en hélice  $\alpha$ , bacteriorodopsina (código PDB 1NTU). (Estructuras tomadas del PDB, disponible en <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

### Asociación de las proteínas de membrana a la bicapa lipídica

Teniendo en cuenta la forma en que las proteínas interaccionan con la membrana plasmática, estas se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellas que atraviesan la membrana completamente (proteínas integrales de membrana) y las que se encuentran asociadas periféricamente a la membrana (Chou & Elrod 1999). Las primeras contienen uno o más

segmentos hidrofóbicos que atraviesan la membrana y se hablará de ellas más adelante. Las proteínas del segundo grupo se asocian a la membrana a través de otras moléculas tal como lípidos mediante procesos de isoprenilación en el extremo C-terminal o miristoilación y palmitoilación en el extremo N-terminal (Resh 1994; Casey 1995) o a través de la unión a una molécula de glicosilfosfatidinositol (GPI) en el dominio C-terminal. También existen otras proteínas que se asocian indirectamente por medio de enlaces no covalentes con otras proteínas de membrana (Figura 1.4).



**Figura 1.4. Asociación de las proteínas de membrana a la bicapa lipídica.** Proteínas que atraviesan la membrana con una sola hélice (1) o múltiples hélices (2), ancladas por una cadena lipídica o un grupo prenil (3), por una molécula de oligosacáridos como GPI (4) y unidas indirectamente a otras proteínas de membrana (5) y (6). (Adaptado de [www.csbio.sjtu.edu.cn/](http://www.csbio.sjtu.edu.cn/))

### **Mecanismos de inserción/translocación de las proteínas en la membrana del retículo endoplásmico**

Existen dos mecanismos principales por los cuales las proteínas de membrana y las de secreción son dirigidas a la bicapa lipídica para ser integradas en ella o transportadas al exterior celular, el mecanismo cotraduccional el cual dirige la proteína mientras esa siendo sintetizada y el postraduccional, el cual la dirige a la membrana una vez que el péptido ha sido completamente traducido.

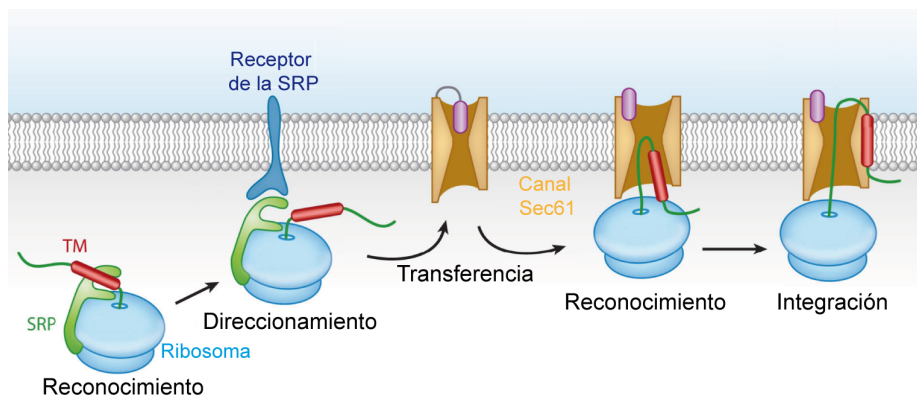
### *Translocación/inserción a través del mecanismo cotraduccional*

En eucariotas, el principal y más estudiado mecanismo de inserción en las membranas del retículo endoplásmico es el de la vía Sec (secretasa dependiente de la SRP, *SRP-dependent secretase*), compuesto principalmente por la partícula de reconocimiento de señal SRP (*signal recognition particle*, un complejo de RNA-proteína que se encuentra distribuido de manera ubicua en todos los organismos, aunque su composición varía entre las distintas formas vivientes (Wiener & White 1992; Keenan et al. 2001)), el receptor de la SRP, SR (*SRP receptor*) y el translocón que forma el canal en la membrana.

El primer paso en esta vía ocurre en los estadios iniciales de la biosíntesis de las proteínas. En el momento en que una región hidrofóbica, de unos 12-20 aminoácidos ubicados hacia el extremo N-terminal de la proteína (denominada secuencia señal) o un dominio transmembrana (Granseth et al. 2005; Zheng & Gierasch 1996) es sintetizado y emerge del ribosoma, es reconocido por la SRP uniéndose a ésta y deteniendo la traducción del péptido. El complejo ternario ribosoma-péptido nascente-SRP es transportado al retículo endoplásmico donde interacciona con el receptor de la SRP, el cual se encarga de transferir el ribosoma y el péptido nascente al translocón Sec61 a través de un paso dependiente de una GTPasa (Keenan et al. 2001; Nyathi et al. 2013) (Figura 1.5).

Cuando el complejo ribosoma-cadena nascente se une al translocón, el péptido se transfiere de la SRP al translocón Sec61, la SRP se disocia y la traducción de la proteína se reinicia, procesos que son controlados por la GTPasa SRP54 y el receptor de la SRP (Keenan et al. 2001; Grudnik et al. 2009). La siguiente fase consiste en el proceso de translocación/inserción de la proteína de membrana en la membrana lipídica del retículo endoplásmico. El poro del canal del translocón se encuentra ubicado en el centro del complejo Sec61. Cuando este interacciona con la secuencia señal o el dominio transmembrana, el anillo de residuos hidrofóbicos se

ensancha y el dominio que actúa a modo de barrera (Figuras 1.5 y 1.8) es desplazado y permite la apertura del canal. En este estado abierto, el translocón promueve el paso de la cadena naciente a través de la bicapa lipídica a la vez que permite un punto de acceso perpendicular a la membrana por medio de un pasaje lateral, favoreciendo la inserción o la translocación del péptido, dependiendo del destino de la proteína. Una vez el péptido es transportado a través del poro, el anillo hidrofóbico y el dominio que actúa a modo de solapa, vuelven a su posición original y el canal del translocón se cierra nuevamente, evitando el paso incontrolado de moléculas (Shao & Hegde 2011).



**Figura 1.5. Translocación/inserción cotraduccional dependiente de la SRP en las células eucariotas.** La SRP (partícula de reconocimiento de señal) interacciona con la secuencia señal hidrofóbica de la proteína apenas ésta es sintetizada. El complejo formado se dirige al retículo endoplásmico a través del receptor de la SRP y se transfiere al canal de translocación Sec61. La reacción de transferencia va acoplada a un segundo paso de reconocimiento, esta vez por el canal Sec61, en el que se produce el desplazamiento de un dominio de la proteína (morado) que facilita el acomodamiento de la cadena naciente. El dominio transmembrana (rojo) se integra en la membrana a través de un acceso lateral a la bicapa lipídica proporcionado por el complejo Sec61. (Tomado de Shao & Hegde 2011).



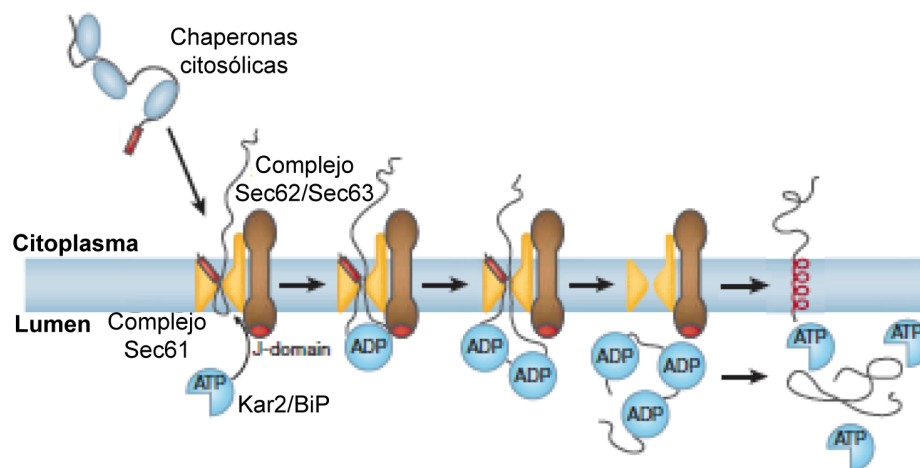
*Translocación/inserción a través del mecanismo postraducciona*

En eucariotas, el sistema cotraducciona es la principal vía para dirigir e insertar las proteínas de membrana en la bicapa lipídica, además de ser la mejor descrita y estudiada (Rapoport 2007). No obstante, varias proteínas, tanto solubles como de membrana, poseen secuencias hidrofóbicas que emergen del ribosoma después de que el polipéptido ha sido completamente sintetizado y que por lo tanto no son sustratos apropiados para ser reconocidos por la SRP. Estas proteínas son translocadas/insertadas por mecanismos diferentes de una manera postraducciona.

Generalmente las proteínas que utilizan este mecanismo, corresponden a proteínas solubles de secreción, como el prepro-factor  $\alpha$  y la prepro-carboxipeptidasa Y (CPY) en *S. cerevisiae*, que tienen regiones de una baja hidrofobicidad y cuya translocación no se ve afectada en ausencia de la SRP (Chou & Elrod 1999; Ng et al. 1996) y a proteínas que tienen la secuencia encargada de su translocación en el extremo C-terminal, (Resh 1994; Wattenberg & Lithgow 2001; Casey 1995) y que por lo tanto necesitan acabar su traducción antes de dirigirse al retículo endoplásmico.

Durante el proceso de inserción/translocación postraducciona en *S. cerevisiae*, el translocón Sec61 interactúa con el complejo tetramérico Sec62/Sec63 y con la chaperona luminal Kar2/BiP, un miembro perteneciente a las ATPasas de la familia Hsp40. En *S. cerevisiae*, el complejo Sec62/Sec63 se encuentra compuesto por las proteínas Sec62 y Sec63, las cuales son esenciales, y las proteínas Sec71 y Sec72. Una vez que la proteína es traducida completamente por el ribosoma en el citosol se cree que se unen al polipéptido recién sintetizado diferentes chaperonas citoplasmáticas. Al menos dos complejos carabinas diferentes, uno que contiene a Hsp70 y otro denominado TriC/CCT (un complejo que lleva la carabina TCP1) han sido descritos. Ambos se unen al sustrato de una forma independiente de la secuencia señal (Goder & Spiess 2001; Plath &

Rapoport 2000). Una vez que el péptido se inserta en el canal, la translocación a través de este ocurre por un movimiento progresivo del péptido. La cadena peptídica dentro del canal se puede mover en cualquier dirección gracias al efecto browniano pero el hecho de unirse con la proteína Kar2/Bip, que se encuentra en el lumen del retículo endoplásmico, impide que la proteína se devuelva hacia el citoplasma. Kar2/Bip provoca la hidrólisis rápida de ATP a ADP que aporta la energía necesaria para que la proteína sea translocada (Figura 1.6) (Zhong & Guidotti 1999; Rapoport 2007; Zhong et al. 2005; Kanner et al. 2002).



**Figura 1.6. Translocación/inserción postraduccional en las células eucariotas.** El péptido recién sintetizado se une a varias chaperonas citosólicas que dirigen la proteína al retículo endoplásmico donde es transferida al translocón. Allí favorecida por la hidrólisis de ATP por parte de la ATPasa Kar2/Bip (esferas azules) la proteína es translocada, si es de secreción o insertada si es de membrana. (Tomado de Rapoport 2007).

### Estructura del translocón

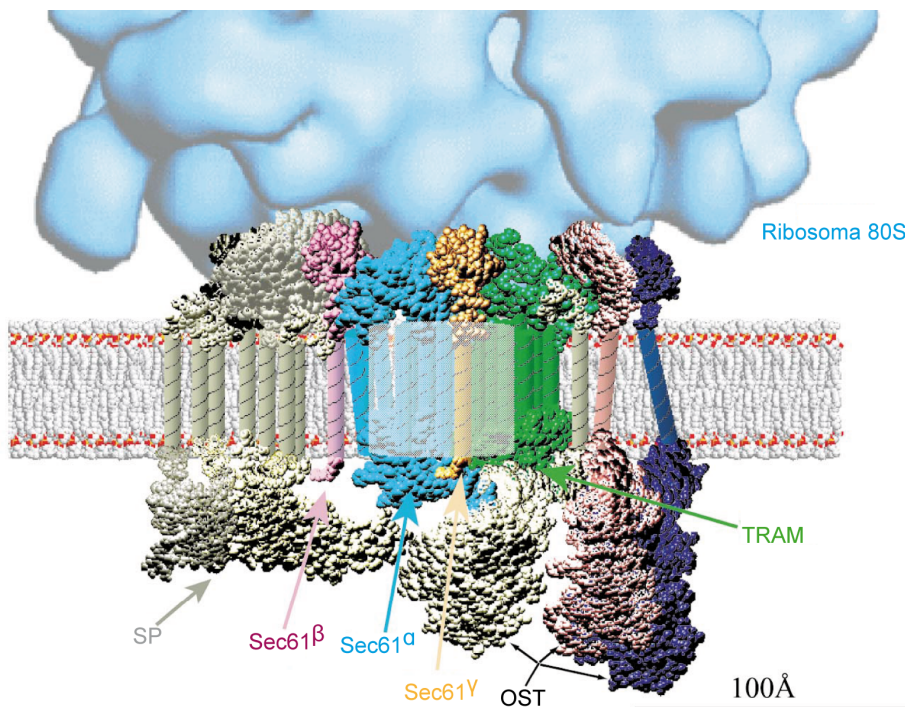
En las células eucariotas, las proteínas de membrana deben ser dirigidas en los estadios iniciales de su síntesis por los ribosomas al retículo endoplásmico, en donde los dominios transmembrana de éstas deben integrarse en la bicapa lipídica, adoptar la topología correcta (Whitley & Mingarro 2014) y adaptar sus estructuras terciarias y cuaternarias en el caso que las posean (Rapoport *et al.* 2004). Para esto, emplean la maquinaria conocida como translocón. El translocón es un complejo multiproteico que forma un canal hidrofílico, que atraviesa la bicapa lipídica, encargado de que los fragmentos transmembrana de las proteínas de membrana se inserten lateralmente en la bicapa y de translocar las regiones extramembranas y las proteínas de secreción al lumen del retículo endoplásmico.

Este canal es un complejo proteico compuesto por Sec61 en eucariotas y SecYEG en bacterias y arqueas, que consta de tres subunidades Sec61 $\alpha$ , Sec61 $\beta$  y Sec61 $\gamma$  en mamíferos y Sec61p, Sec61 $\beta$  y Sss1p en *S. cerevisiae* (Mothes *et al.* 1994; van den Berg *et al.* 2004). Además en mamíferos en el translocón también se encuentra asociada la proteína TRAM (*translocating chain-associating membrane*) (Tamborero *et al.* 2011). Estos cuatro componentes juntos son capaces de reproducir la actividad del translocón en membranas lipídicas purificadas del retículo endoplásmico, constituyendo así el núcleo principal del translocón en eucariotas (Görlich & Rapoport 1993) (Figura 1.7).

#### *El complejo Sec61*

Sec61 es un complejo heterotrimérico de proteínas de membranas. Las subunidades Sec61 $\alpha$  y Sec61 $\gamma$  están altamente conservadas en todos los organismos y son esenciales tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae*. Por el contrario, la subunidad Sec61 $\beta$  no es necesaria para la viabilidad celular y

no se encuentra tan conservada entre los eucariotas y las eubacterias. La comparación de las estructuras cristalinas del complejo Sec de arqueas con las obtenidas por criomicroscopía electrónica de los complejos Sec61 de mamíferos y SecY de *E. coli* indican un alto grado de similitud estructural entre ellos en los diferentes organismos (Ménéret *et al.* 2008; Becker *et al.* 2009)



**Figura 1.7. Complejo proteico del translocón en mamíferos.** Modelo que muestra los diferentes componentes del translocón en un plano perpendicular a la membrana lipídica y aproximadamente a escala. Los segmentos transmembrana se muestran como cilindros con las dimensiones de una hélice promedio. Para simplificar el esquema solo se muestra un heterotrímero Sec61, un ribosoma a escala y el poro de translocón, de unos 50 Å, con un color transparente en el centro. También se muestra la presencia de la peptidasa del péptido señal (SP, en gris), el complejo oligosacaril transferasa (OST, en rosa) y la proteína TRAM (en verde). (Tomado de Johnson & van Waes 1999).

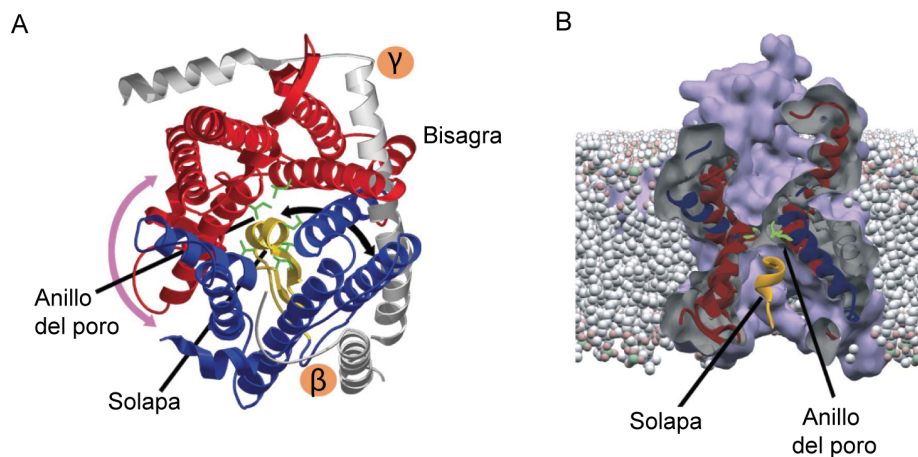
### *La subunidad $\alpha$ del complejo Sec*

La subunidad  $\alpha$  es el componente principal del translocón ya que es el canal por el que pasan las proteínas. Con un peso molecular de 53 kDa, atraviesa la membrana diez veces y presenta sus dos extremos N- y C-terminal orientados hacia el citosol. Estructuralmente, la proteína puede dividirse en dos partes, una mitad N-terminal que contiene los segmentos transmembrana 1-5 y una mitad C-terminal con los segmentos transmembrana 6-10. La zona central en donde se unen estas regiones forman un espacio a través del cual el polipéptido nascente es transportado y alineado con el túnel de salida del ribosoma (Becker *et al.* 2009) (Figura 1.8A). Cuando se encuentra en un estado inactivo, la entrada citoplasmática del canal tiene un diámetro de 20-25 Å. Hacia la mitad de la membrana, el tamaño del canal de translocación disminuye a 5-8 Å. Allí existe un anillo de residuos hidrofóbicos seguido de una hélice transmembrana que bloquea el canal. El canal vuelve a aumentar su anchura hacia la salida al lumen del retículo endoplásmico, dándole una forma de reloj de arena desde un punto de vista lateral (Figura 1.8B) (Martínez-Gil *et al.* 2011). El tamaño del poro no es rígido y se ha observado que este puede incrementar notablemente su diámetro, debido probablemente a la necesidad de soportar múltiples segmentos transmembrana de proteínas con varios dominios transmembrana (Hamman *et al.* 1997).

### *La subunidad $\beta$ del complejo Sec*

La subunidad  $\beta$  es una proteína del complejo Sec61 que tiene un tamaño de 10 kDa y un dominio transmembrana localizado cerca de los segmentos 1 y 4 de la subunidad  $\alpha$  (Figura 1.8A). Esta subunidad no es esencial ni para la translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico ni para la inserción de dominios transmembranas en la bicapa lipídica, aunque parece que sí facilita la translocación cotraduccional de las

proteínas (Kalies *et al.* 1998) e interacciona con la SRP, probablemente ayudando en el reconocimiento de translocones libres por parte del complejo ribosoma-polipéptido naciente-SRP (Jiang *et al.* 2008). Esta participación de la subunidad  $\beta$  en el proceso de translocación se ve apoyada por la interacción directa de ésta con el péptido naciente y con el ribosoma (Levy *et al.* 2001)



**Figura 1.8. Estructura del canal de translocación.** **A.** Estructura cristalina del complejo SecYEG de arqueas, equivalente al Sec61 de mamíferos, vista desde el citosol. La subunidad  $\alpha$  consta de dos partes, los segmentos transmembrana 1-5 y 6-10 (azul y rojo, respectivamente) los cuales abren una especie de puerta lateral en el frente (flecha púrpura). Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  se muestran en gris. **B.** Vista lateral del canal que evidencia el estrechamiento central, que evita el paso incontrolado de moléculas de un lado a otro de la membrana. (Tomado de Rapoport 2007)

#### La subunidad $\gamma$ del complejo Sec

La subunidad  $\gamma$ , el componente más pequeño, 7,7 kDa, contiene dos hélices alfa conectadas por una horquilla (Figura 1.8A). La primera

hélice se ubica de manera paralela al lado citosólico de la membrana y se une al lado citoplasmático del extremo C-terminal de la subunidad  $\alpha$ . La otra hélice atraviesa la membrana perpendicularmente interaccionando con los dos extremos N- y C-terminal de la subunidad  $\alpha$ , funcionando como una especie de bisagra que mantiene juntas las dos partes de la subunidad Sec61 $\alpha$  (van den Berg *et al.* 2004).

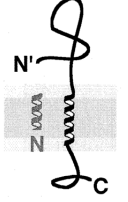
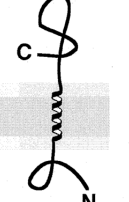
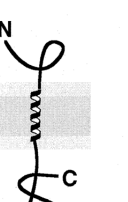
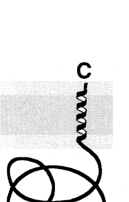
### **Topología de las proteínas integrales de membrana**

Las proteínas integrales de membrana que presentan un solo segmento hidrofóbico que atraviesa la bicapa lipídica se pueden clasificar en cuatro tipos según la secuencia y maquinaria implicada en su mecanismo de inserción y según su topología. Estas proteínas pueden presentar una orientación citoplasmática del extremo N-terminal y exoplasmática del C-terminal ( $N_{\text{cit}}/C_{\text{exo}}$ ) o la contraria ( $N_{\text{exo}}/C_{\text{cit}}$ ) (Higy *et al.* 2004) (Figura 1.9).

1. Proteínas de membrana tipo I: Estas proteínas son inicialmente dirigidas a la membrana del retículo endoplásmico por una secuencia péptido señal ubicada en el extremo N-terminal, formada generalmente por 7-15 residuos principalmente apolares, la cual se corta después de su inserción por la acción de la peptidasa (SP, ver Figura 1.7). La proteína se ancla a la membrana por un dominio hidrofóbico posterior que actúa como una secuencia de parada de translocación, evitando que el resto del polipéptido atravesase la membrana. La proteína madura queda con un nuevo extremo N-terminal ( $N'$ ) orientado hacia la zona luminal o extracelular y el C-terminal ubicado hacia el citoplasma ( $N_{\text{exo}}/C_{\text{cit}}$ ).

2. Proteínas de membrana tipo II: Estas proteínas no tienen una secuencia péptido señal, a diferencia de las anteriores. Aquí, una misma secuencia hidrofóbica, generalmente interna de 18-25 residuos apolares y que no se corta después de dirigirse a la membrana, es la responsable de la

inserción y el anclaje en la membrana del retículo endoplásmico. Estas proteínas presentan una orientación topogénica con el dominio N-terminal hacia el citoplasma y el dominio C-terminal translocado al lumen ( $N_{\text{cit}}/C_{\text{exo}}$ ).

Determinantes topogénicos	Secuencia señal cortada + secuencia de parada de translocación	Secuencia señal de anclaje	Secuencia señal de anclaje inversa y parada de translocación	Señal en C-terminal
Maquinaria de translocación	SRP/SR/SEC 61 + peptidasa	SRP/SR/SEC 61	SRP/SR/SEC 61	GET/TRC40
Tipo de señal	Región de inserción en N-terminal		Señal de inserción en N-terminal	Señal de inserción en C-terminal
Lumen o exoplasma				
Citoplasma				
	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo II</b>	<b>Tipo III</b>	<b>Tipo IV</b>
Ejemplos	Glicoforina Receptor LDL	Receptor de transferrina Galactosil transferasa	Sinaptotagmina Neuregulina Citocromo P-450	Sinaptobrevina Citocromo B5

**Figura 1.9. Topología e inserción de las proteínas de membrana.** Diferentes tipos de proteínas de membrana de acuerdo a sus señales topogénicas y mecanismos de inserción en la membrana plasmática. (Adaptado de Goder & Spiess 2001).

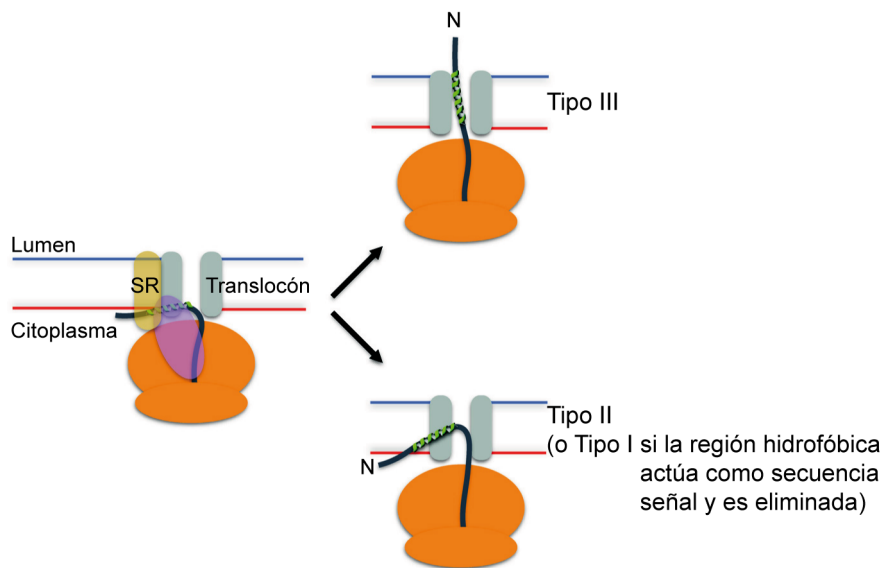
3. Proteínas de membrana tipo III: Estas proteínas también tienen una secuencia señal interna similar a las del grupo anterior, aunque la secuencia señal inversa de estas proteínas provoca que el dominio N-terminal se transloque a través de la membrana, quedando el dominio N-terminal orientado hacia el lumen ( $N_{\text{exo}}/C_{\text{cit}}$ ) (Figura 1.9). Las proteínas de membrana de los tres grupos son insertadas por la misma maquinaria de translocación cotraduccional que incluye la SRP, el receptor de la SRP y el translocón Sec61. No obstante, algunas proteínas del membrana del tipo III



con grandes dominios N-terminal deben de translocarse postraduccionalmente, ya que la señal de anclaje ubicada en el extremo C-terminal aparece después de que la proteína es sintetizada (Zhong & Guidotti 1999; Zhong *et al.* 2005).

Al encontrarse el péptido nascente en el translocón Sec61, el péptido señal se puede reorientar haciendo que el extremo N-terminal se ubique hacia el citosol (Figura 1.10), dando a la proteína una orientación  $N_{\text{cit}}/C_{\text{exo}}$  (proteínas tipo II; Figura 1.9), o no hacerlo, dándole una topología  $N_{\text{exo}}/C_{\text{cit}}$  (tipo I y tipo III; Figura 1.9). Puesto que las proteínas de membrana del tipo II translocan su dominio C-terminal de la secuencia señal hacia el lumen del retículo endoplásmico, el péptido debe dar un giro de  $180^\circ$  después de disociarse del ribosoma para adoptar la topología correcta. Aún se sabe poco sobre como ocurre este proceso (Whitley & Mingarro 2014) (Figura 1.10). La topología final de la secuencia señal es un producto de varios factores, como la carga de los residuos flanqueantes, su hidrofobicidad, la composición lipídica de la membrana, entre otros (Bogdanov *et al.* 2002; Higy *et al.* 2004; Goder *et al.* 2004; Saurí *et al.* 2009)

4. Proteínas de membrana tipo IV: Estas son una clase de proteínas que presentan su extremo N-terminal orientado hacia el citosol y se anclan a la membrana plasmática por una secuencia hidrofóbica ubicada en el extremo C-terminal de la proteína (Figura 1.9), por lo cual también son denominadas como proteínas ancladas por el extremo C-terminal (*C-tail anchored*). La inserción de estas proteínas ocurre de forma postraduccional por un mecanismo independiente de la SRP, ya que la secuencia hidrofóbica emerge del ribosoma al finalizar la síntesis del polipéptido (Borgese *et al.* 2003). Para este tipo de proteínas se ha propuesto un sistema dependiente de un complejo diferente, denominado TRC40 en mamíferos y Get3 en *S. cerevisiae* (Hegde & Keenan 2011).



**Figura 1.10. Modelos de inserción de dominios transmembrana.** La disociación de la SRP del receptor SR (SR) y del ribosoma (naranja) transfiere la señal hidrofóbica (hélice verde) al translocón y la elongación del polipéptido naciente se reinicia. La inserción del dominio transmembrana puede tomar dos orientaciones: el N-terminal se puede translocar a través de la membrana (Tipo III) o reorientarse por medio de una horquilla quedando con el dominio N-terminal hacia el citoplasma (Tipo II). Si en ésta última la secuencia señal es escindida la proteína puede ser de secreción o pertenecer a las del Tipo I si presenta un segmento TM en C-terminal. (Tomado de Whitley & Mingarro 2014).

## Principales características de las hélices $\alpha$ de las proteínas de membrana

### Tamaño de las hélices $\alpha$

La longitud de las hélices  $\alpha$  de las proteínas de membrana se encuentra condicionada por el ambiente hidrofóbico de las membranas en las cuales se insertan. Puesto que la distancia de translación de un aminoácido en una hélice canónica es de 1,5 Å, una serie de 20 residuos

hidrofóbicos unidos consecutivamente podrían atravesar los 30 Å del núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica ideal, mencionado anteriormente. No obstante, esta longitud determinada por métodos bioinformáticos, varía de acuerdo a las bases de datos y a los algoritmos empleados. Así, analizando 45 fragmentos transmembrana, un estudio observó que la longitud variaba ampliamente, cubriendo desde los 14 hasta los 39 residuos, con una longitud promedio de 26,4 residuos (Bowie 1997), mientras que otro ensayo que utilizó 129 fragmentos transmembrana se obtuvo una longitud promedio de 27,1 residuos (Ulmschneider & Sansom 2001).

Por otro lado, existen estudios que demuestran valores que difieren ligeramente de los mostrados arriba y que están mas cercanos a lo esperado. En otro estudio realizado con un grupo de 101 secuencias transmembrana, la longitud promedio fue de 23,2 residuos (Papaloukas *et al.* 2008), mientras que se encontró un promedio de 24 residuos de longitud en otro análisis que incluyó 837 fragmentos transmembrana (Baeza-Delgado *et al.* 2013). Los datos de longitudes de las hélices transmembrana mejoran a medida que se depositan y anotan cada vez mas secuencias de proteínas transmembrana en las bases de datos. Además la longitud de 20 residuos no es completamente restrictiva y en el proteoma pueden existir fragmentos transmembrana tan cortos como de 10-12 residuos de leucina que pueden ser insertados en la membrana por el translocón Sec61 (Jaud *et al.* 2009) o tan grandes como 40 residuos, como en el caso del receptor de glutamato en bacterias, que tiene hélices  $\alpha$  de 38 residuos de longitud (Papaloukas *et al.* 2008).

#### *Composición de aminoácidos*

El ambiente hidrofóbico propio del núcleo de las membranas celulares en el cual han de insertarse las hélices de las proteínas de membrana determina que los fragmentos transmembrana estén principalmente compuestos por residuos no polares. De hecho, los

aminoácidos hidrofóbicos Leu, Ala, Val e Ile son los más abundantes, entre el 37-47%, siendo también más abundantes en proteínas hidrofóbicas que en proteínas solubles (Ulmschneider & Sansom 2001; Baeza-Delgado *et al.* 2013).

Los residuos Gly y Pro también se encuentran en una proporción significativa en las hélices transmembrana a pesar de que por su estructura, estos residuos se caracterizan por tener una baja propensión a formar parte de estructuras helicoidales. Su presencia puede justificarse por el hecho de que son componentes de los motivos de dimerización que permiten interacciones entre los fragmentos transmembrana en el caso de la glicina (Senes *et al.* 2000; Kim *et al.* 2005), y modulando el empaquetamiento de las hélices y de la función de las proteínas en las membranas biológicas en el caso de la prolina (Orzáez *et al.* 2004). Otro residuo, la leucina, un aminoácido que actúa como un formador de hélices, también se encuentra dos veces más en los fragmentos transmembrana que en las proteínas solubles o en las hojas  $\beta$  (Ulmschneider & Sansom 2001).

Por otro lado, existe una mayor proporción de los residuos altamente polares Glu, Lys, Asp, Arg, His y Gln en las hélices de las proteínas solubles que en los fragmentos transmembrana, constituyendo apenas un 9% de los residuos dentro de la bicapa lipídica, lo cual era de esperar, puesto que las cadenas laterales de estos aminoácidos desestabilizan las membranas (Illergård *et al.* 2010; Baeza-Delgado *et al.* 2013) y reducen considerablemente la capacidad de inserción de las hélices (Lundin *et al.* 2008). No obstante, son residuos que están conservados en algunas proteínas de membrana lo cual puede llegar a explicarse por el hecho de que pueden estar relacionados directamente con la función de la proteína, puesto que los residuos polares están a menudo implicados en varios procesos como la unión a otras moléculas, transporte y catálisis, entre otros (Illergård *et al.* 2010)

La presencia de residuos aromáticos no polares como Phe también promueve la inserción de los fragmentos transmembrana en la membrana,

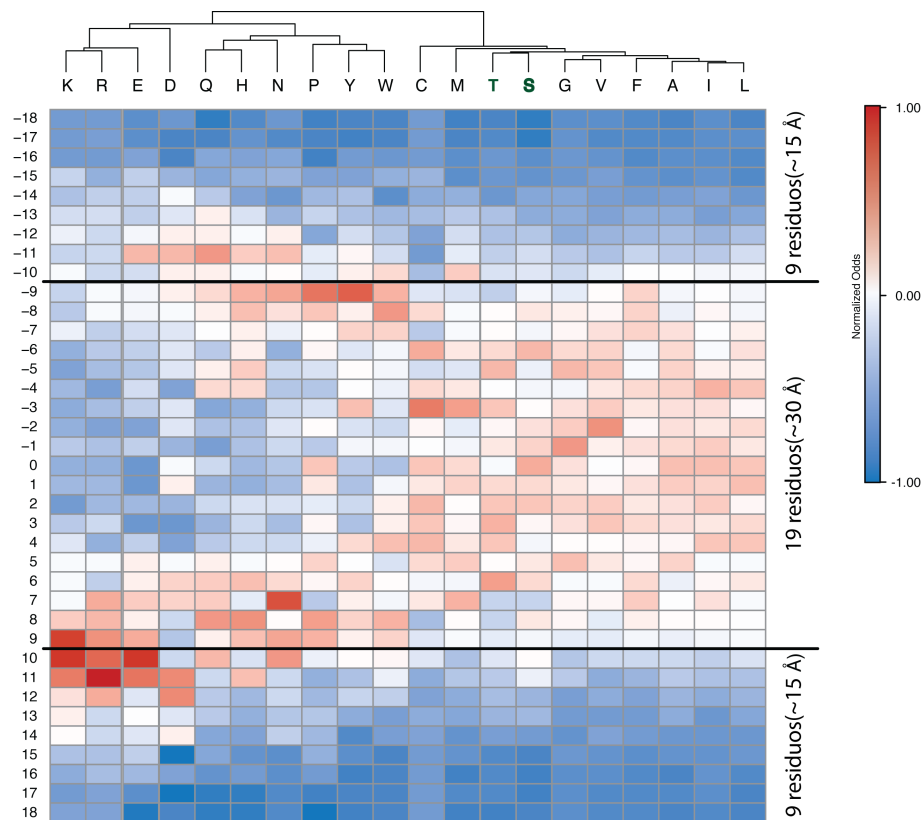
mientras que residuos polares débiles como Cys, Met y Ser apenas si tienen un efecto reductor sobre la capacidad de inserción del dominio transmembrana (Hessa *et al.* 2005; Lundin *et al.* 2008).

#### *Posición de los aminoácidos en los segmentos transmembrana*

Para que las hélices transmembrana sean reconocidas por el translocón e insertadas en la membrana no solo es necesario que la hidrofobicidad total del fragmento transmembrana sea alta sino que la posición de los residuos también sea la adecuada. Los aminoácidos Trp y Tyr reducen notablemente la inserción en membranas cuando se encuentran ubicados en una posición central de la hélice, pero si se encuentran en los extremos esta restricción disminuye, siendo por ejemplo Trp tan favorable a la inserción como el residuo Leu, cuando el primero se encuentra en las posiciones más externas de la hélice (Hessa *et al.* 2005). Posiblemente, Trp y Tyr se encuentren mejor ubicados en los extremos de las hélices porque de esta manera pueden interactuar mejor con los grupos polares de los fosfolípidos de las membranas.

También se ha encontrado que algunos residuos no presentan una preferencia significativa en cuanto a la posición en la hélice transmembrana. Se ha observado que la Gly, junto con los residuos Ser y Thr, aminoácidos con grupos hidroxilo en sus cadenas laterales, se hallan distribuidos equitativamente a lo largo del centro hidrofóbico de la membrana (Figura 1.11). Esto podría atribuirse a que en el caso de Gly se permite un empaquetamiento íntimo entre hélices y a la capacidad de la Ser y Thr de formar puentes de hidrógeno a través de su grupo funcional, y puesto que estos enlaces existen en cualquier región del fragmento transmembrana, se favorece la distribución ubicua de estos residuos a lo largo de la hélice  $\alpha$  (Baeza-Delgado *et al.* 2013). Por otro lado, los residuos polares, tanto los fuertes (His, Asn y Gln) como los débiles (Cys y Met) tienden a ubicarse en los extremos de las hélices transmembrana, prefiriendo la región interfacial

de las membranas, donde se encuentra un ambiente anfipático mas afín a la naturaleza de estos aminoácidos.



**Figura 1.11. Tipos de aminoácidos y distribución de su posición en las hélices transmembrana.** Cada aminoácido y su posición en la hélice transmembrana se representa por su probabilidad normalizada. Los aminoácidos están agrupados basados en su probabilidad posicional normalizada dentro de la hélice. Las posiciones marcadas con valores positivos indican el lado citoplasmático de la membrana y su región flanqueante mientras que las posiciones marcadas negativamente indican regiones extra-citoplasmáticas. En la parte superior se destaca en negrita el residuo serina, debido a su relevancia en esta Tesis. (Adaptado de Baeza-Delgado *et al.* 2013)

### *Helicidad*

La conformación de la estructura secundaria en hélice  $\alpha$  es un aspecto crítico en la inserción a la membrana. Esto es así porque no solo es necesaria una región altamente hidrofóbica sino que también ésta debe ser capaz de adoptar una conformación helicoidal para que sea reconocida por la maquinaria del translocón (Martínez-Gil *et al.* 2011). El efecto hidrofóbico es la principal fuerza que conduce a los fragmentos transmembrana a formar una estructura secundaria en hélice  $\alpha$ , estabilizada por la formación intramolecular del máximo número de puentes de hidrógeno. La presencia en la hélice de aminoácidos totalmente hidrofóbicos, como se ha mencionado anteriormente, permite que aminoácidos con poca tendencia a formar hélices puedan existir, puesto que la energía libre global es superior a la que se necesita para estabilizar la estructura en el ambiente hidrofóbico de las membranas. Además, en proteínas de membrana con varios segmentos transmembrana, una hélice altamente estable puede ayudar a estabilizar las hélices adyacentes a través de la formación de horquillas helicoidales en donde dos hélices están conectadas por un segmento peptídico corto (Bañó-Polo *et al.* 2013).

Al parecer, el plegamiento del dominio transmembrana ocurre durante la inserción en la membrana, aunque se ha determinado que algunas hélices  $\alpha$  se pliegan en el túnel de salida del ribosoma en estadios iniciales de la biogénesis de este tipo de proteínas, adoptando su estructura secundaria, probablemente antes de insertarse en la membrana (Mingarro *et al.* 2000; Woolhead *et al.* 2004).

### *Fuerzas implicadas en el plegamiento de las proteínas de membrana*

El plegamiento de una proteína de membrana es una consecuencia de las interacciones existentes entre las hélices transmembrana, ya sean

las suyas o las de proteínas vecinas. Estas interacciones pueden ser de diferentes tipos, enumerándose a continuación las predominantes.

1. Enlaces iónicos / puentes salinos. Los puentes salinos son interacciones electrostáticas entre iones de carga opuesta. Dentro del ambiente hidrofóbico de la capa lipídica, la constante dieléctrica es muy baja y la interacción de un puente salino es por lo tanto más fuerte. Los residuos cargados (Lys, Arg, His, Asp y Glu) no son muy comunes en las regiones transmembrana pero se encuentran presentes (Bañó-Polo *et al.* 2012), aportando en las reacciones que lleven a cabo la formación de los puentes salinos. Esta fuerza electrostática también es la única que es capaz de actuar a través de una distancia significativa

2. Puentes de hidrógeno. Un puente de hidrógeno es la interacción entre un átomo con un par de electrones no apareado (O, N, etc) y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un átomo fuertemente electronegativo (N, F, O). El átomo electronegativo atrae los electrones del átomo de hidrógeno, dejándolo con una carga parcial positiva. El átomo de carbono también puede tomar el lugar del electronegativo, produciendo un puente de hidrógeno mas débil. En las proteínas de membrana, los esqueletos de las hélices transmembrana pueden hacer parte de estos puentes de hidrógeno más débiles (CαH...O). Los puentes de hidrógeno mas fuertes que involucran los residuos Asn, Asp, Gln y Glu están implicados en la oligomerización de las hélices (Choma *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2000; Gratkowski *et al.* 2001; Zhou *et al.* 2001). La fuerza de los enlaces de hidrógeno depende de la distancia, la química y el arreglo de los átomos involucrados, y de la naturaleza del ambiente que los rodea, que es altamente hidrofóbico en el centro de la membrana.

3. Fuerzas Van der Waals. Las moléculas no polares pueden volverse dipolos temporalmente si su densidad electrónica se distribuye desigualmente a medida que los electrones se mueven. Si están lo suficientemente cercanos, un dipolo puede inducir un dipolo temporal en



una molécula apolar vecina, permitiendo una interacción electrostática. Cuanto más cercanas estén las moléculas más fuerte es la interacción. Los residuos presentes en las regiones transmembranas tienden a estar más compactos que los residuos de las proteínas solubles o los de las regiones extramembranas, lo que facilita un aumento en la probabilidad de formación de interacciones van der Waals, aunque éstas no necesariamente sean uniones fuertes.

4. Interacciones hidrofóbicas. Esta no es propiamente una fuerza física como las anteriores. Esta se observa cuando los grupos hidrofóbicos, tales como las cadenas laterales de Leu, Ile, Val y Phe, tienden a agruparse juntas en el interior de la proteína, excluyendo el agua. Los grupos hidrofóbicos conducen a un decrecimiento en el número de puentes de hidrógeno que se pueden formar, ya que el número de moléculas de agua alrededor también se reduce. Las moléculas de agua responden adoptando una conformación más ordenada alrededor de los grupos hidrofóbicos, afectando la conformación de la estructura proteica.

5. Motivos implicados en el empaquetamiento de las hélices. Existe un número de motivos que permiten que las hélices transmembrana se empaqueten de una manera más estrecha. Para esto, residuos pequeños se encuentran separados de tal forma que sus cadenas laterales se encuentran orientadas en el mismo lado de la hélice, es decir,  $i, i+4$  o  $i+7$ , lo cual crea una superficie que permite un mejor acercamiento entre cadenas. La principal proteína en donde se han caracterizado estos motivos es la glicoforina A, una sialoglicoproteína de la membrana celular de los eritrocitos humanos, la cual forma dímeros estables en SDS gracias a la interacción entre su único dominio transmembrana. Aquí se encontró la presencia de la secuencia GxxxG (donde x es cualquier aminoácido), motivo que se repite con hasta en el 50% de las proteínas de membrana que se han estudiado posteriormente (Senes *et al.* 2000; Teese & Langosch 2015). La importancia de este motivo se basa principalmente en la presencia de Gly (*glycine zipper*), siendo esta la secuencia mínima necesaria que

conduce la interacción de los fragmentos transmembrana en las membranas, por lo que otros motivos significativamente representados en las proteínas de membrana como (G, A, S)xxxGxxxG y GxxxGxxx(G, S, T) también han sido encontrados. (Russ & Engelman 2000; Kim *et al.* 2005).

Estos motivos con glicinas también pueden encontrarse combinados con residuos de mayor tamaño como Val, Leu o Ile, en las posiciones cercanas a los residuos de glicina. Igualmente se puede ver una ligera asociación con residuos más pequeños como Ala y Ser, como se indicó anteriormente (por ejemplo, el motivo GxxxGxxx(G, S, T)) (Russ & Engelman 2000). La principal función de estos motivos de glicina es la homodimerización de los fragmentos transmembrana, lo que permite un empaquetamiento apropiado de las proteínas de membrana dado que permiten una interacción íntima entre hélices (Orzáez *et al.* 2000).

En las proteínas de membrana también se ha observado la capacidad de dimerización de éstas en ausencia de los motivos de glicina. Existe evidencia que los residuos polares presentes en las hélices transmembrana (como se mencionó en un apartado anterior) contribuyen a la dimerización de los fragmentos, incluso en presencia de los motivos de dimerización de glicina (Zhou *et al.* 2000). Pero residuos como Ser y Thr también han sido identificados en los motivos SxxSSxxT y SxxxSSxxT, los cuales son capaces de inducir la dimerización de los fragmentos transmembrana (Dawson *et al.* 2002), posiblemente por su capacidad en la formación de puentes de hidrógeno que ayudarían a estabilizar las interacciones que se den entre las hélices transmembrana.

### **Glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico**

Muchas proteínas translocadas al retículo endoplasmático son glicosiladas. En general, la glicosilación es una modificación cotraduccional de proteínas que expande la diversidad del proteoma. La glicosilación de las proteínas está implicada en muchos procesos celulares como el

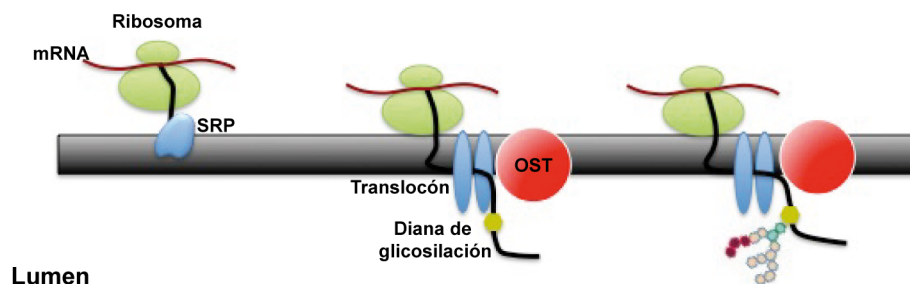
reconocimiento intracelular o el plegamiento y la estabilidad de proteínas (Mitra *et al.* 2006; Weerapana 2006; Jiang *et al.* 2008). En levadura, existen tres tipos de glicosilación acoplada a la ruta secretora, la N-glicosilación (adición de azúcares a residuos de Asn), la O-glicosilación (adición de azúcares a residuos de Ser o Thr) y la modificación por GPI (adición de un glicosilfosfatidil inositol al extremo C-terminal de la proteína).

La N-glicosilación es la modificación predominante en las células eucariotas y la que más ha sido estudiada (Chavan *et al.* 2005; Mitra *et al.* 2006), siendo la más relevante en el presente trabajo (Figura 1.12). En este proceso, a medida que la proteína entra en el lumen del retículo endoplásmico a través del translocón Sec61, la enzima oligosacaril transferasa (OST) asociada al complejo del translocón (Figura 1.7), rastrea los residuos Asn localizados en la secuencia diana Asn-Xaa-Ser/Thr (donde Xaa corresponde a cualquier aminoácido excepto prolina). Estos residuos son modificados covalentemente por la adición de un complejo preformado de carbohidratos compuesto por tres residuos de glucosa, nueve manosas y dos acetilglucosaminas (Glc3Man9GlcNAc2). En los organismos eucariotas, el donador de este oligosacárido proviene de la ruta metabólica del lípido dolicol pirofosfato, a través de la adición secuencial de los monosacáridos (Kelleher 2005). A este núcleo de oligosacáridos se le agregan posteriormente más residuos de manosa, lo que aumentará de manera considerable la variabilidad funcional y estructural de las glicoproteínas.

La OST es un complejo multimérico con un peso molecular de 700 kDa, localizado en la membrana del retículo endoplásmico con el centro activo orientado hacia el lumen (Matsumoto *et al.* 2013; Pfeffer *et al.* 2014). Varias de las proteínas que lo conforman están bastante conservadas, desde protozoos hasta mamíferos. El complejo OST más estudiado es el de *S. cerevisiae*, el cual incluye nueve diferentes subunidades asociadas a la membrana (Dempski & Imperiali 2002). Este complejo enzimático se encuentra asociado al translocón, puesto que la transferencia de los carbohidratos al residuo de Asn diana de la proteína ocurre mientras ésta

aún se está sintetizando y por lo tanto emergiendo por el translocón. Debido a la disposición del sitio activo de la OST se requiere una longitud mínima (aproximadamente 14 aminoácidos de distancia si se encuentra en posición N-t del segmento transmembrana o a 12 residuos si se encuentra en posición C-t) hasta el residuo de Asn de la secuencia consenso para que la diana puede ser eficientemente glicosilada (Nilsson & Heijne 2000; Stefansson *et al.* 2004).

#### Citosol



**Figura 1.12. Glicosilación cotraduccional.** Glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico por acción de la Oligosacaril transferasa (OST). (Adaptado de Weerapana 2006).

#### Degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico

En general, los niveles de proteínas en las células están controlados no solamente por su tasa de síntesis sino también por su tasa de degradación. Esto le permite a las células tener un control más eficiente sobre procesos clave como la regulación de factores de transcripción, la respuesta a estímulos externos, la actividad de enzimas intracelulares, además de la eliminación de proteínas mal traducidas o mal plegadas que signifiquen un daño para las funciones celulares. En las células eucariotas

existen dos mecanismos principales de degradación proteica, la proteólisis en los lisosomas y la ruta ubiquitina-proteasoma o UPS, por sus siglas en inglés *ubiquitin-proteasome system* (Cooper 2000).

La señalización de las proteínas que se degradaran por medio de la vía UPS se hace a través de la unión de la ubiquitina al sustrato mediante una cascada enzimática. Primero, la ubiquitina es adenilada por la enzima de activación de la ubiquitina E1. A continuación la ubiquitina es transferida a un residuo de cisteína de la enzima de conjugación a la ubiquitina E2. Finalmente la ligasa ubiquitina E3 acerca el complejo E2-ubiquitina a la proteína que va a ser degradada y favorece la transferencia de la ubiquitina a ésta, generalmente a la cadena lateral de un residuo de lisina de la proteína a degradar, que queda así etiquetada (Zattas & Hochstrasser 2015).

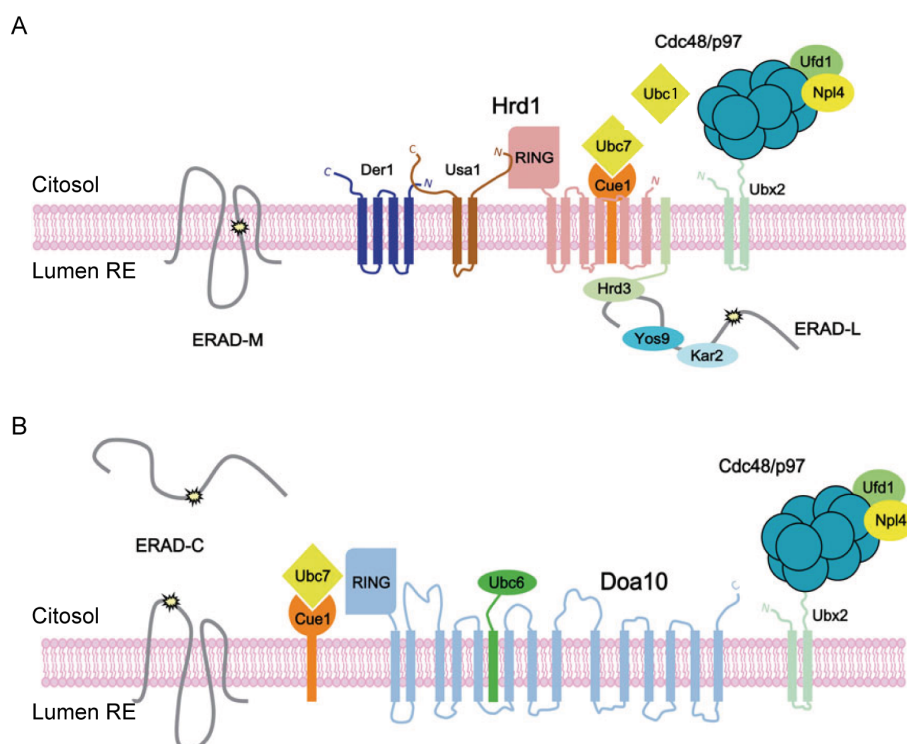
Este proceso de degradación se lleva a cabo de forma mayoritaria sobre proteínas citosólicas o nucleares en diferentes organelos celulares. Dado que muchas proteínas tiene que translocarse al lumen del retículo endoplásmico para terminar su maduración, en este compartimento celular también existe un mecanismo dedicado a eliminar las proteínas desnaturalizadas que se encuentren en el lumen o en la membrana del retículo endoplasmático y presentarlas a la maquinaria encargada de su posterior degradación. Este mecanismo, que se encuentra conservado en todos los eucariotas, se denomina ERAD (*ER-associated (protein) degradation*) (Bonifacino & Weissman 1998).

En *S. cerevisiae* solo existe una enzima E1, llamada Uba1, proteína esencial que se encuentra bien caracterizada. En cuanto a las del grupo E2 existen 11 enzimas diferentes (Ubc1-13), de las cuales solo tres cumplen una función en la ruta ERAD, Ubc1, Ubc6 y Ubc7 (Lemus & Goder 2014). En cuanto a las ligasas E3 en *S. cerevisiae* existen dos que se encuentran dentro de la ruta ERAD, Hrd1/Der3 (que interacciona principalmente con Ubc7 y en menor medida con Ubc1 (Bays *et al.* 2001)) y Doa10 (que interacciona con Ubc6 y Ubc7). Estas ligasas E3 se encargan básicamente

de reconocer las secuencias específicas que inician el proceso de degradación (degrones) en los dominios citoplasmáticos (ERAD-C), luminales (ERAD-L) o de membranas (ERAD-M) de los sustratos mal plegados (Figura 1.13) (Kawaguchi & Ng 2007).

La ligasa E3 Hrd1 interacciona principalmente con la enzima E2 Ubc7, la cual es reclutada al retículo endoplásmico y activada por Cue1. Hrd3 es también un componente del complejo y se encarga de reconocer sustratos mal plegados que se encuentren en el lumen (ERAD-L). La ubiquitinación y translocación de los sustratos ERAD-L pero no los sustratos mal plegados de la membrana (ERAD-M) requieren la presencia de Der1. El complejo Cdc48 es reclutado al retículo endoplásmico por la proteína adaptadora Ubx2. Los sustratos ubiquitinados son retirados del retículo endoplásmico por Cdc48 y sus cofactores Ufd1 y Npl4 (Figura 1.13A) (Zattas & Hochstrasser 2015).

El otro sistema implica a la proteína de membrana Doa10. Esta proteína tiene 14 segmentos transmembrana. Esta ligasa E3 inicialmente marca para la ubiquitinación proteínas solubles citosólicas mal plegadas o proteínas de membrana que presenten dominios dañados o mal plegados en las regiones citoplasmáticas (ERAD-C). La ubiquitinación de la mayoría de los sustratos ERAD-C requiere de dos enzimas E2, Ubc6 y Ubc7. Ubc6 esta anclada por su dominio C-terminal al retículo endoplásmico, siendo a su vez un sustrato de Doa10. El complejo Cdc48 también se requiere para la degradación de sustratos ERAD-C de las membranas del retículo endoplásmico, pero no para los sustratos citoplasmáticos (Figura 1.13B) (Zattas & Hochstrasser 2015).



**Figura 1.13. Sistema ERAD en *S. cerevisiae*.** **A.** Complejo HRD1. La ligasa E3 Hrd1 interacciona principalmente con la enzima E2 Ubc7, la cual es reclutada al retículo endoplásmico y activada por Cue1. El dominio citosólico de Hrd3 participa también en el reconocimiento del sustrato. Un sustrato luminal mal plegado (ERAD-L) es reconocido inicialmente por la lectina Yos9, la proteína Kar2 y/o Hrd3. La ubiquitinación de sustratos ERAD-L, pero no sustratos ERAD-M requieren la presencia de Der1, el cual es reclutado al complejo HRD por medio de Usa1. **B.** Complejo DOA10. Doa10 tiene 14 segmentos transmembrana. Esta ligasa se encarga de marcar para ubiquitinación proteínas solubles citosólicas mal plegadas (sustratos ERAD-C). La ubiquitinación de estos sustratos requieren dos E2s, Ubc6 y Ubc7. (Tomado de Zattas & Hochstrasser 2015).

### **Uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para estudios bioquímicos y moleculares**

La levadura *S. cerevisiae* es el microorganismo más usado de manera industrial además de haber demostrado ser un conveniente modelo eucariota en el campo de la investigación dado su carácter unicelular. *S. cerevisiae* pertenece al reino *Fungi* y comparte una arquitectura celular común y un ciclo de vida rudimentario con los eucariotas multicelulares como plantas y animales. Además, como microorganismo no patógeno e inmóvil, puede ser fácilmente propagada, conservada y manipulada en el laboratorio. Como todos los eucariotas, las células de levadura tienen numerosos organelos limitados por membranas, incluyendo el núcleo, mitocondrias, peroxisomas y aquellos implicados en la ruta de secreción. *S. cerevisiae* posee un genoma de aproximadamente 6000 genes distribuidos en 16 cromosomas nucleares, siendo el primer organismo eucariota que fue completamente secuenciado en 1996 (Goffeau *et al.* 1996). Su genoma es muy compacto para ser un eucariota: el número y tamaño de los genes es relativamente pequeño y la densidad genética es relativamente alta. El tiempo de generación es muy corto (alrededor de 90 minutos), así que poblaciones muy grandes de individuos pueden cultivarse y analizarse muy rápidamente. Esto es esencial para analizar problemas y establecer modelos que requieren la observación de eventos raros tales como mutaciones genéticas. Lo que finalmente hace de la levadura un organismo modelo para la investigación es la facilidad que presenta para su manipulación genética incluyendo la inserción y delección de genes dentro de la célula, ya sea a través de plásmidos o directamente sobre los cromosomas. Así se puede mutagenizar o manipular la expresión genética y estudiar los efectos fenotípicos resultantes con relativa facilidad (Duina *et al.* 2014).



### **Rot1, una proteína de membrana de *Saccharomyces cerevisiae***

Rot1 es una proteína de membrana esencial de la levadura *S. cerevisiae*. Esta proteína fue identificada cuando se estaba haciendo un rastreo para identificar *loci* que suprimieran mutantes en las rutas TOR1 y TOR2, de ahí el nombre del gen (*ROT1, Reversal of TOR2*) (Bickle *et al.* 1998). Contiene 256 residuos y tiene un peso molecular predicho de 28 kDa, aunque su movilidad electroforética es de 50 kDa aproximadamente, debido principalmente a que la proteína sufre modificaciones postraduccionales al ser N-glicosilada en el retículo endoplásmico en tres posiciones, los residuos N103, N107 y N139. No obstante, estas modificaciones no son completamente esenciales para el correcto funcionamiento de la proteína, puesto que solamente la eliminación de los tres sitios de glicosilación simultáneamente producen una reducción parcial en su función, mientras la eliminación de un solo sitio de glicosilación no presenta ningún efecto deletéreo en la viabilidad de la célula (Juanes *et al.* 2008).

La proteína Rot1 es esencial para la célula ya que se ha visto que la delección completa o parcial del gen o su represión condicional produce que las células de levadura sean inviables (Bickle *et al.* 1998; Juanes *et al.* 2008). Sin embargo, aún no se ha determinado de forma clara el papel que cumple la proteína en la célula y el porqué de su esencialidad. Varios estudios han aportado evidencias que la relacionan con la biosíntesis de la pared celular, ya que al no expresarse la proteína Rot1 los niveles de 1,6- $\beta$ -glucano, un componente de la pared celular de la levadura, se reducen (Bickle *et al.* 1998; Machi *et al.* 2004), provocando células con paredes celulares más débiles e inviables. También se ha encontrado que posiblemente la proteína Rot1 interaccione *in vivo* con la chaperona Bip1/Kar2 ya que se han detectado interacciones físicas con esta proteína mediante experimentos de coimmunoprecipitación. Este hecho indicaría que

Rot1 podría participar en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático (Takeuchi 2006; Takeuchi *et al.* 2008).

En nuestro grupo se han descrito otras características de la proteína Rot1 que la vinculan con otros procesos en las células de *S. cerevisiae*. Se han encontrado evidencias que indican que Rot1 tiene un papel en el crecimiento polarizado de las células, especialmente en el crecimiento apical después de que se ha producido la yema en las células de levadura, aunque no tiene una relación directa con el ensamblaje del citoesqueleto de actina (Juanes *et al.* 2007).

Resultados previos de nuestro grupo también determinaron una relación directa entre la estabilidad de la ciclina Clb2 y la proteína Rot1, ya que se observó como la inactivación de la proteína Rot1 hace que la ciclina se estabilice y no se degrade, provocando que las células de levadura detengan su ciclo en la fase G2/M del ciclo celular (Juanes *et al.* 2007). Por lo tanto, todos los resultados obtenidos demuestran que la proteína Rot1 puede estar implicada en múltiples procesos y se hace necesario determinar a nivel molecular su papel en cada uno de estos.

La proteína Rot1 se localiza en la membrana perinuclear del retículo endoplasmático, donde se ancla gracias a un único dominio hidrofóbico de 28 residuos ubicado en el extremo C-terminal (Takeuchi 2006; Juanes *et al.* 2008), con una topología en la que el dominio N-terminal se localiza en el lumen del retículo endoplásmico y el extremo C-terminal se encuentra orientado hacia el citoplasma. De acuerdo a la clasificación de las proteínas de membrana mostrada previamente en la Figura 1.9, Rot1 sería una proteína especial en cuanto a que ninguna de las categorías la representa satisfactoriamente. En cualquier caso podría considerarse como una proteína tipo III, aunque esta clase de proteínas son translocadas cotraduccionalmente y las secuencias de translocación están en el extremo N-terminal, características que no se encuentran en la proteína Rot1.

Resultados previos obtenidos en nuestro grupo demostraron que el dominio transmembrana ubicado en el extremo C-terminal que permite la

inserción de Rot1 en la membrana, no es necesario ni para la translocación de la proteína al retículo endoplásmico ni para su glicosilación, pero si es crítico para la función de la proteína. Este hecho se pudo comprobar al reemplazar este segmento por una secuencia hidrofóbica, de forma que se pudo recuperar su capacidad de inserción en la membrana pero no la función de la proteína y en consecuencia, la viabilidad celular (Juanes *et al.* 2008). Así pues, esta proteína es lo suficientemente particular e interesante, tanto desde el punto de vista bioquímico como funcional, para que su estudio permita ampliar el conocimiento actual sobre las proteínas de membrana y su relación con la viabilidad de las células de levadura.



## Objetivos

Para caracterizar con detalle la proteína de membrana Rot1 de *S. cerevisiae* en el presente trabajo se propusieron los siguientes objetivos:

1. Determinar los residuos del dominio transmembrana de la proteína Rot1 importantes para su correcto funcionamiento.
2. Describir los dominios de la proteína Rot1 implicados en el proceso de transporte e inserción en la membrana del retículo endoplásmico.
3. Identificar el mecanismo y el complejo asociado a la membrana del retículo endoplásmico encargado de la degradación de la proteína Rot1
4. Realizar una búsqueda de amplio rango de posibles proteínas que interaccionen con Rot1 (interactoma), con las cuales pueda estar asociada para llevar a cabo su(s) función(es) dentro de la célula.



## 2. Materiales y Métodos

---

### **Técnicas empleadas en *Escherichia coli***

#### *Cepas y condiciones de crecimiento*

Las cepas de *E. coli* empleadas fueron la DH5 $\alpha$  y la NT326. Estas células se crecieron en medio LB (extracto de levadura 0.5%, triptona 2%, NaCl 1%) o en medio mínimo M9 [sales M9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl y NH<sub>4</sub>Cl) 1X, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM, maltosa 0.4%] respectivamente, suplementados con ampicilina 50  $\mu$ g/mL y/o estreptomycin 25  $\mu$ g/mL de acuerdo con la resistencia de las cepas. Para la preparación de placas en medio sólido se añadió agar bacteriológico 2%. Todos los medios se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos a 1 atm de presión y 120°C. Los cultivos se crecieron a 37°C durante toda la noche, o en el caso de las placas de medio mínimo M9 a 37°C durante tres días.

### *Transformación de células*

Células electrocompetentes de la cepa DH5 $\alpha$  fueron transformadas por choque eléctrico con los productos obtenidos de la ligación del DNA inserto-vector o de la mutagénesis dirigida. Para esto se utilizó un electroporador *E. coli Pulser<sup>TM</sup>* (Bio-Rad) con unas condiciones de pulso 1.8 kV, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ . Una vez electroporadas, las células se recuperaron en medio LB incubando durante 1 hora a 37°C antes de sembrarlas en placas de LB agar suplementadas con ampicilina 50  $\mu$ g/mL. Las placas se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

La transformación de células termocompetentes NT326 se realizó por choque térmico con los plásmidos de interés. Para esto se mantuvieron las células en hielo durante 10 min, se añadió el plásmido a transformar y se incubó la mezcla durante 30 min a 4°C. Después se provocó un choque térmico durante 1 min a 42°C y pasándolas 2 min a 4°C. Seguidamente, se añadieron 200  $\mu$ L de LB y se dejaron recuperar incubando durante 1 h a 37°C antes de sembrarlas en placas de LB agar suplementadas con ampicilina 50  $\mu$ g/mL y estreptomycin 25  $\mu$ g/mL. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C.

### *Construcción de plásmidos*

#### *a. Construcción del plásmido pTOXR-(ROT1 237-256)-MBP*

El plásmido *pTOXR-(ROT1 237-256)-MBP* se obtuvo por clonación de un fragmento de DNA desde el nucleótido +709 hasta el nucleótido +768 del gen *ROT1* amplificado por PCR desde DNA genómico de levadura y digerido con las enzimas de restricción *NheI* y *BamHI*. Después, el fragmento de restricción obtenido se subclonó en el vector *pcckAN*, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.



*b. Construcción del plásmido pGEM-ROT1 237-256*

Para la construcción del plásmido *pGEM-ROT1-237-256* se amplificó por PCR un fragmento de DNA desde el nucleótido +709 hasta el nucleótido +768 del gen *ROT1* a partir de DNA genómico de levadura. El fragmento amplificado fue luego digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *SpeI* y subclonado en el vector *pGEM1*.

*Mutagénesis dirigida*

Para introducir las mutaciones puntuales (inserciones y sustituciones de nucleótidos) en las secuencias de DNA de plásmidos, se utilizó el kit *QuikChange Site-directed Mutagenesis* (Agilent Technologies). Las parejas de oligonucleótidos utilizados para cada caso de mutagénesis fueron diseñados empleando el programa *QuikChange Primer Design* (disponible en <http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>) y sintetizados por *Thermo Scientific*. Las mutaciones puntuales en los plásmidos para cada caso se introdujeron mediante PCR consistente en 20 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 90 s de hibridación de oligonucleótidos a 52°C y 12 min de elongación de la polimerasa *Pfu* a 68°C. Los plásmidos originales, que conservaban la secuencia silvestre del gen y que sirvieron de molde para la reacción, fueron eliminados incubando la mezcla con la enzima de restricción *DpnI* durante 3 h a 37°C. Posteriormente, se transformaron células *DH5α* electrocompetentes con los plásmidos mutagenizados. El DNA plasmídico de algunas de las colonias obtenidas fue extraído y enviado a secuenciar al *Servei de Seqüenciació de la Universitat de València* para confirmar las mutaciones resultantes.

### *Ensayo ToxCAT*

Se recogieron 6 OD a una absorbancia  $A_{420}$  de un cultivo líquido de células de *E. coli* NT326 transformadas con los plásmidos que codifican las construcciones *pToxR-MBP* y se resuspendieron en tampón de sonicación (Tris-HCl 25 mM, EDTA 2 mM, pH 8) para lisarlas por ultrasonificación. Se tomó una alícuota del extracto (20  $\mu$ L) para analizar por *western blot*, detectando la construcción empleando el anticuerpo anti-MBP, mientras que el resto del lisado fue clarificado centrifugando a 13000 g durante 15 min. La cantidad de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) se cuantificó por un inmunoensayo colorimétrico utilizando el kit *CAT-ELISA (Roche)*. Las mediciones se hicieron por triplicado y se normalizaron con respecto a los niveles de expresión de la proteína obtenidos en el *western blot*.

### *Expresión in vitro de proteínas*

Las construcciones de Rot1-TM237-256 y los controles de translocación e inserción clonados en el plásmido *pGEM1* fueron transcritas y traducidas con el sistema *TNT® SP6 Quick Coupled System (Promega)*. La mezcla de la reacción de traducción, compuesta por el *TNT® Master Mix*, DNA molde, [ $^{35}$ S]Met/Cys y microsomas rugosos (RM) provenientes de páncreas de perro (*tRNA Probes*), se incubó durante 90 min a 30°C. La mezcla de la reacción se diluyó en 10 volúmenes de citrato de sodio y la fracción de membranas se recogió por densidad colocando la mezcla de reacción sobre un colchón de sacarosa y centrifugando a 40000 rpm durante 20 min a 4°C en una ultracentrífuga *Beckman* con un rotor TLA-55. Para el ensayo de protección de la Proteinasa K se agregó 1  $\mu$ L de enzima a una alícuota de la reacción de traducción y se incubó la digestión durante 15 min a 4°C. Para detener la reacción se añadió PMSF 1mM. Finalmente los pellets fueron analizados por *SDS-PAGE* y los geles se visualizaron en

el equipo *Typhoon FLA 7000* (GE Healthcare) usando el programa *Typhoon™ FLA 7000 V. 1.2*.

### **Técnicas empleadas en *Saccharomyces cerevisiae***

#### *Cepas de S. cerevisiae*

Las cepas de levadura empleadas en este trabajo se muestran en la Tabla 2.1. El marcaje de los genes o el cambio de promotor endógeno al promotor *GAL* se realizó utilizando casetes de disrupción obtenidos por PCR de los plásmidos de la serie *pFA6* (Longtine *et al.* 1998). El cambio de promotor endógeno al promotor *tetO7* se realizó empleando el plásmido *pCM225* (Bellí *et al.* 1998). La cepa de *ROT1* etiquetada con el epítipo TAP en el extremo C-terminal fue adquirida en *Open Biosystems*.

#### *Condiciones de crecimiento*

Las células de *S. cerevisiae* se crecieron en medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona bacteriológica 2%, glucosa 2%), medio mínimo sintético SD (*Yeast Nitrogen Base* 0,67%, glucosa 2%, mezcla de aminoácidos *Drop out*), YPGal ó SD-Gal (galactosa 2% en lugar de glucosa) e YPRaf ó SD-Raf (rafinosa 2% en lugar de glucosa). Para la preparación de placas de medio sólido se añadió agar bacteriológico 2%. Los medios se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos a 1 atm de presión y 120°C. Las cepas resistentes a geneticina se crecieron en placas de YPD o YPGal suplementadas con geneticina 200 µg/mL. Para reprimir el promotor *tetO7* se prepararon las placas o medios de cultivo con doxiciclina 10 µg/mL. Todas las placas se dejaron crecer durante 3 días a 28°C.

**Tabla 2.1 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae***

<b>CEPA</b>	<b>GENOTIPO</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
<i>W303-1a</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1</i>	Nuestro grupo
<i>CML240</i>	<i>MATa ade2 ura3 leu2 his3 tro1 can1 CMV p(tetR'-SSN6)::LEU2</i>	Grupo de E. Herrero
<i>tetO7:ROT1</i>	<i>kanMX4-tetO7:ROT1 en CML240</i>	Nuestro grupo
<i>GAL1:HA-ROT1</i>	<i>kanMX6-GAL1:3HA- ROT1 en W303-1a</i>	Nuestro grupo
<i>GAL1:HA-ROT1 (26-256)</i>	<i>kanMX6-GAL1:3HA- ROT1(26-256) en W303-1a pROT1</i>	Nuestro grupo
<i>GAL1:HA-ROT1 (61-256)</i>	<i>kanMX6-GAL1:3HA- ROT1(61-256) en W303-1a pROT1</i>	Nuestro grupo
<i>GAL1:HA-ROT1 (91-256)</i>	<i>kanMX6-GAL1:3HA- ROT1(91-256) en W303-1a pROT1</i>	Nuestro grupo
<i>GAL1:HA-ROT1 (26-228)</i>	<i>TRP1 ROT1(26-228) en GAL1:HA-ROT1 (26-256)</i>	Nuestro grupo
<i>GAL1:HA-ROT1 (61-228)</i>	<i>TRP1 ROT1(61-228) en GAL1:HA-ROT1 (61-256)</i>	Nuestro grupo
<i>GAL1:HA-ROT1 (91-228)</i>	<i>TRP1 ROT1(91-228) en GAL1:HA-ROT1 (91-256)</i>	Nuestro grupo

**Tabla 2.1 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae***

<b>CEPA</b>	<b>GENOTIPO</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
<i>GAL1:HA-ROT1 (26-199)</i>	<i>TRP1 ROT1(26-199)</i> en <i>GAL1:HA-ROT1 (26-256)</i>	Nuestro grupo
<i>GAL1:HA-ROT1 (26-149)</i>	<i>TRP1 ROT1(26-149)</i> en <i>GAL1:HA-ROT1 (26-256)</i>	Nuestro grupo
<i>GAL1:HA-ROT1 (61-199)</i>	<i>TRP1 ROT1(61-199)</i> en <i>GAL1:HA-ROT1 (61-256)</i>	Nuestro grupo
<i>GAL1:HA-ROT1 (91-199)</i>	<i>TRP1 ROT1(91-199)</i> en <i>GAL1:HA-ROT1 (91-256)</i>	Nuestro grupo
<i>tetO<sub>7</sub>:ubc1</i>	<i>ura::CMV-tTA ubc1</i> en BY4741	Open Biosystems
<i>MHY501</i>	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52, leu2-3,112, his 3-200, trp 1-1, lys2-801.</i>	Grupo de Hochstrasser
<i>ubc6</i>	<i>HIS3::ubc6</i> en <i>MHY501</i>	Grupo de Hochstrasser
<i>ubc7</i>	<i>HIS3::ubc7</i> en <i>MHY501</i>	Grupo de Hochstrasser
<i>ubc6/ubc7</i>	<i>HIS3::ubc6 LEU2::ubc7</i> en <i>MHY501</i>	Grupo de Hochstrasser
<i>hrd1/doa10</i>	<i>LEU2::hrd1 HIS3::doa10</i> en <i>MHY501</i>	Grupo de Hochstrasser

**Tabla 2.1 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae***

<b>CEPA</b>	<b>GENOTIPO</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
<i>doa10</i>	<i>HIS3::doa10</i> en <i>MHY501</i>	Grupo de Hochstrasser
<i>hrd1</i>	<i>LEU2::hrd1</i> en <i>MHY501</i>	Grupo de Hochstrasser
<i>ROT1-Myc</i>	<i>ROT1-13Myc-TRP1</i> en <i>W303-1a</i>	Este trabajo
<i>BY4741</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3</i>	<i>Open Biosystems</i>
<i>ROT1-TAP</i>	<i>ROT1-TAP::TAP-HIS3MX6</i> en <i>BY4741</i>	<i>Open Biosystems</i>
<i>ROT1-TAP DEF1-HA</i>	<i>DEF1-3HA-kanMX6</i> en <i>ROT1-TAP</i>	Este trabajo
<i>DEF1-HA</i>	<i>DEF1-3HA-kanMX6</i> en <i>BY4741</i>	Este trabajo
<i>DEF1-Myc</i>	<i>DEF1-13Myc-kanMX6</i> en <i>W303-1a</i>	Este trabajo
<i>KAR2-6FLAG</i>	<i>MATa trp1 leu2 his3 ura3 tTA-LEU2 KAR2- FLAG-Kan</i>	Grupo de M. Aldea
<i>SEC62-6FLAG</i>	<i>MATa trp1 leu2 his3 ura3 tTA-LEU2 SEC62- FLAG-Kan</i>	Grupo de M. Aldea

En los ensayos de crecimiento en goteos se prepararon diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000) de cultivos en fase exponencial de las diferentes cepas después de igualarlos a una concentración aproximada de  $1.5-3.0 \times 10^6$  células/mL. En cada serie se colocaron 5  $\mu$ L del cultivo concentrado y de cada una de las diluciones preparadas. Se utilizaron placas de YPD e YPD suplementadas con doxiciclina 10  $\mu$ g/mL y se dejaron crecer durante 3 días a 28°C.

#### *Transformación de levaduras*

Las transformaciones con plásmidos y productos de PCR se realizaron siguiendo el método de transformación LiAc/PEG (Gietz et al. 1995). Se recogieron  $2 \times 10^8$  células de cultivos de levadura en fase exponencial y se resuspendieron en LiAc/TE 1X. Se les añadió en primer lugar DNA de esperma de salmón (10  $\mu$ g/ $\mu$ L) desnaturalizado y después el plásmido o el fragmento de DNA de interés (100 ng). Luego se agregó una solución de PEG 40% más LiAc/TE, se incubó la mezcla de transformación a 30°C durante 30 min en agitación y se realizó un choque térmico a 42°C durante 15 min. La selección de los transformantes se llevó a cabo creciéndolos en placas de medio mínimo con la auxotrofia apropiada. En los transformantes cuya selección era la resistencia a geneticina, las células se dejaron recuperando en YPD o YPGal durante toda la noche antes de sembrarlas en placas suplementadas con el antibiótico. Las placas se incubaron durante 3 días a 28°C.

#### *Construcción de los plásmidos pROT1-3HA-CEN y pGAL1:ROT1-3HA.*

Los plásmidos *pROT1-HA* y *pGAL1:ROT1-HA*, los cuales tienen tres copias del epítipo HA integrados entre los nucleótidos 543 y 544 fueron construidos previamente en el laboratorio de Ciclo Celular (Juanes et al. 2008).

### *Extractos de proteína total y western blot*

Para realizar la extracción de proteínas se recogieron  $10^8$  células de cultivos en fase exponencial. Las células se resuspendieron en NaOH 0.1M y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugaron a 10000 rpm durante 1 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50  $\mu$ L de tampón de carga (SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.02%, DTT 0.1M, Tris-Hcl 0.125M pH 7.5) y se incubó durante 5 min a 95°C. A continuación se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, obteniéndose el extracto de proteína total. La normalización de las muestras se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 595 nm con el reactivo *Bradford (Bio-Rad)*, para inyectar el inverso de esta medida en los geles de poliacrilamida.

Las proteínas extraídas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sodio-dodecil-sulfato (*SDS-PAGE*) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante electro-transferencia. Las membranas se bloquearon durante 1 hora en solución bloqueadora (leche en polvo 2% en TBS-Tween-20 0.01%) y se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4° C. Después de lavar con TBS-T (3 veces x 15 min), se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1h a 4°C y se volvieron a lavar con TBS-T (3 veces x 15 min). Los anticuerpos utilizados para los diferentes análisis se indican en la Tabla 2.2. La detección se llevó a cabo utilizando los reactivos *ECL Western blotting (GE Healthcare-Amersham Bioesciences)* siguiendo las instrucciones del fabricante. El revelado de las membranas se llevó a cabo mediante autorradiografía utilizando una película fotográfica (*Fuji Medical X-Ray Film 100NIF Super RX*) o el analizador de quimioluminiscencia *ImageQuant LAS4000mini Biomolecular Imager (GE Healthcare)*.



**Tabla 2.2 Anticuerpos utilizados para detección de proteínas por western blot**

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>
<i>Anti-HA-Peroxidase 3F10 rat monoclonal High Affinity (Roche) 1:10000</i>	_____
<i>Anti-HA 3F10 rat monoclonal High Affinity (3F10) antibody (Roche) 1:6000</i>	<i>Anti-rat IgG Peroxidase linked 1:20000</i>
<i>Anti-c-myc 9E10 mouse monoclonal 1:2000</i>	<i>Anti-mouse IgG Peroxidase linked 1:10000</i>
<i>Anti-TAP rabbit polyclonal (Open biosystems) 1:5000</i>	<i>Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:20000</i>
<i>Anti MBP 1:2000</i>	_____

*Fraccionamiento subcelular*

Se recogieron  $5 \times 10^8$  células de cultivos en fase exponencial, las células se resuspendieron en 300  $\mu$ L de tampón de lisis (sorbitol 0.1M,  $KCH_3CO_2$  50mM, EDTA 2mM, HEPES 20mM pH 7.5 y DTT 1mM) suplementado con inhibidores de proteasas (*Roche*) y se rompieron mediante agitación vigorosa en presencia de perlas de vidrio a 4°C durante tres pulsos de un minuto. Los extractos celulares se centrifugaron a 700 g durante 5 min para clarificar el sobrenadante. Este se dividió en tres

alícuotas que se sometieron a los siguientes tratamientos durante 1 h en hielo: tampón de lisis, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1M pH 11.5 y Triton X-100 1% más NaCl 0.5M. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 40000 rpm en una ultracentrífuga *Beckman* con el rotor TLA-55 durante 1 hora a 4°C para separar la fracción soluble (S) de la fracción de membranas (P). Cantidades equivalentes de proteína de las diferentes fracciones se separaron por *SDS-PAGE* y se analizaron por *western blot*.

#### *Tratamiento con Endoglicosidasa H*

Extractos totales de proteínas se prepararon a partir de  $1 \times 10^8$  células de levadura de cultivos en fase exponencial. Las células se resuspendieron en tampón Tris-Hcl 50 mM pH 7.5 suplementado con inhibidores de proteasas (*Roche*) y se lisaron mediante agitación vigorosa en presencia de perlas de vidrio durante tres pulsos de un minuto a 4°C. El lisado se clarificó de los restos celulares por centrifugación a 2000g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se desnaturalizó añadiendo un volumen de tampón de desnaturalización (Tris-Hcl 1mM pH 7.5, DTT 40 mM, SDS 0.5%) y se incubaron durante 5 minutos a 95°C. Las muestras se diluyeron a la mitad ajustándolas a una concentración final de 0.2mM de acetato de amonio pH 5.5 y se separaron en dos alícuotas que se incubaron durante 2 horas a 37°C en presencia o ausencia de endoglicosidasa H 50 mU (*Roche*). Las proteínas se separaron por *SDS-PAGE* y se detectaron por *western blot*.

#### *Purificación por afinidad en tándem (TAP)*

La proteína Rot1 se utilizó como cebo para la purificación de proteínas que interactúan con ella mediante purificación TAP. Se recogieron 3-4 OD A600 de células centrifugando a 6000 rpm durante 20 min a 4°C y se resuspendieron en tampón de lisis (NaCl 0.1 M, Tris-HCl 50

mM pH 7.5, MgCl 1.5 mM y Triton X-100 0,1%) suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). Las células se centrifugaron nuevamente a 6000 rpm durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se congeló en nitrógeno líquido. Para lisar las células se añadió al pellet tampón de lisis con DTT 1 mM e inhibidores de proteasas y se rompieron mediante una agitación vigorosa en presencia de perlas de vidrio durante 6 pulsos de 3 minutos a 4°C. El extracto se clarificó centrifugándolo a 4000 rpm durante 10 min a 4°C, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se volvió a centrifugar a 12000 rpm durante 90 min a 4°C. Al sobrenadante se le añadió glicerol 5% y se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización.

La purificación de la proteína se realizó incubando el extracto con perlas *IgG Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare)* durante 1 h a 4°C. Se centrifugaron las perlas a 1800 rpm durante 3 min a 4°C y se transfirieron a una columna *Mobicol Classic (MoBiTec)*. Las perlas se lavaron tres veces con tampón de lisis más DTT 0.5 mM por gravedad y luego se realizó la digestión con la proteasa TEV (*Tobacco etch virus*) en la misma columna añadiendo 10 µL e incubando la mezcla durante 2 h a 16°C.

Para la segunda purificación, se mezclaron en una columna *Mobicol Classic* el eluido obtenido de la digestión con la proteasa TEV, perlas de calmodulina *Calmodulin Affinity Resin* y tampón de lisis más CaCl<sub>2</sub> 4 mM y DTT 1 mM y se incubaron durante 1 h a 4°C. Pasado este tiempo, las perlas se lavaron con tampón de lisis más CaCl<sub>2</sub> y DTT 1 mM y se añadió el tampón de elución (EGTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y NaCl 50 mM) incubándose durante 10 min a 37°C. Ese proceso se repitió tres veces y el eluido se colectó por centrifugación. A continuación se añadió TCA 10% y se precipitó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min a 4°C, se lavó el pellet con acetona fría y se centrifugó nuevamente. El pellet resultante se analizó por espectrometría de masas en el *Servei de Proteòmica de la Universitat de València* para identificar las proteínas obtenidas en la purificación.

#### *Coinmunoprecipitación con Dynabeads Protein G*

Aproximadamente  $5 \times 10^8$  células de levadura se resuspendieron en 100  $\mu$ L de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0,1% y PMSF 1 mM) suplementado con inhibidor de proteasas (*Roche*) y se rompieron mediante agitación vigorosa en presencia de perlas de vidrio. Las perlas y los restos celulares se eliminaron y el sobrenadante se clarificó centrifugando a 13000 g por 5 minutos. 50  $\mu$ L de perlas magnéticas *Dynabeads Protein G (Life Technologies)* se lavaron dos veces con PBS 1x-Tween 0,02% y se incubaron con el anticuerpo monoclonal *anti-HA 3F10* durante 20 min a 25°C en agitación. Después de lavarlas nuevamente se incubaron con el extracto celular durante 90 min a 4°C en agitación. Después de varios lavados, las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron hirviendo las perlas en presencia de tampón de carga durante 5 min a 95°C. Las proteínas se analizaron en geles *SDS-PAGE* y se visualizaron por *western blot*.

#### *Coinmunoprecipitación con perlas de sefarosa*

Se recogieron 100 OD600 de cultivos celulares de levadura en fase exponencial y se resuspendieron en 300  $\mu$ L de tampón de lisis (NaCl 100 mM, HEPES K-OH pH 7.6 20 mM,  $MgCl_2$  5 mM, glicerol 10%, Triton X-100 0,1%) suplementado con inhibidor de proteasas (*Roche*). Las células se rompieron en presencia de perlas de vidrio durante 15 min a 4°C en un vortex *Genie-2 (Scientific Industries)*. Las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 min, se lavaron las perlas de vidrio con 400  $\mu$ L de tampón de lisis y los dos sobrenadantes obtenidos se combinaron y se centrifugaron a 13000 g durante 20 min a 4°C. Las proteínas obtenidas en el extracto se incubaron con perlas *IgG Sepharose 6 fast flow (GE Healthcare)*, (previamente lavadas tres veces con tampón de lisis), durante 90 min a 4°C en agitación para inmunoprecipitar las proteínas marcadas con la etiqueta

TAP. Después se recogió la fracción no retenida y se lavaron las perlas de sefarosa 3 veces con tampón de lisis. La elución se llevó a cabo con 100  $\mu$ L de SDS 1% a 65°C durante 15 min. Las fracciones se incubaron con tampón de carga, se separaron por *SDS-PAGE* y se analizaron por *western blot*.

#### *Entrecruzamiento*

Se recogieron  $2 \times 10^8$  células de levadura, se resuspendieron en 150  $\mu$ L de tampón PBS 1X y se lisaron mediante agitación vigorosa en presencia de perlas de vidrio durante tres pulsos de un minuto a 4°C. El extracto se clarificó centrifugando a 4000 rpm durante 2 min. Al sobrenadante se le agregó Triton X-100 1% durante 30 min a 4°C y se tomaron 50  $\mu$ g de proteína para cada ensayo. A cada una de las muestras se le añadió el entrecruzador *Ethylene glycol bis(succinimidylsuccinate) EGS* (*Thermo Scientific*) disuelto en DMSO a diferentes concentraciones (0, 0.5, 1 y 3 mM) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción de entrecruzamiento se detuvo con Tris-HCl 50 mM pH 7.5 durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las proteínas se extrajeron con tampón de carga con SDS 8% llevándolas a 95°C por 15 minutos, se separaron por *SDS-PAGE* y se analizaron por *western blot*.

#### *Inmunofluorescencia indirecta*

Se partió de  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  células procedentes de cultivos en fase exponencial. Las células se fijaron con un tampón A (fosfato potásico 100 mM pH 6.4,  $MgCl_2$  0.5 mM y formaldehído 3.7%) durante 2 h a 30°C (o toda la noche a 4°C). Después se lavaron con un tampón B (igual composición que el tampón A pero en lugar de formaldehído se añade sorbitol 1.2M). Para la obtención de esferoplastos se incubaron las células en el tampón B con  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1% y zimoliasa 20-T 200  $\mu$ g/mL durante 20 min. Los esferoplastos se lavaron con tampón B y muestras de 5-10  $\mu$ L de estos se

distribuyeron en portaobjetos multipocillos. Las muestras se bloquearon con PBS 1X-BSA 1% y se lavaron entre las incubaciones con los anticuerpos con esta misma solución. Se incubaron con el anticuerpo primario *anti-HA High Affinity 3F10 (Roche)* en una dilución 1:50 en PBS 1X-BSA 1% durante 3h a 4°C. A continuación se lavaron las muestras y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rat conjugado con el fluoróforo *Alexa546 (Molecular Probes)* en una dilución 1:500 durante 1 h a 4°C. Para teñir los núcleos se añadió el reactivo DAPI (*Sigma*) 0.1µg/mL durante 2 minutos y se lavaron con PBS 1X-BSA 1%. Los pocillos del portaobjetos se cubrieron con glicerol 50% y finalmente se selló el cubreobjetos. Las muestras se visualizaron con un microscopio de fluorescencia *Axioskop 2 de Zeiss Inc.* Las fotografías se realizaron con una cámara *AxioCam MRm (Zeiss Inc.)* y el programa *AxioVision v4.7 (ZeissInc.)*.

### **Análisis informático de la secuencia de Rot1**

La predicción del dominio transmembrana de la proteína Rot1 se realizó usando nueve de los métodos mas comunes disponibles en Internet: *DAS* (Cserző *et al.* 1997) (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html>), *PhDHTM* (Rost *et al.* 1996) (<https://www.predictprotein.org>), *MEMSAT3* y *MEMSAT-SVM* (Jones 1999) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), *TMHMM* (Krogh *et al.* 2001) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), *TMPred* ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)), *ΔG Prediction Server* (Hessa *et al.* 2007) (<http://dgpred.cbr.su.se/index.php?p=home>), *SPOCTOPUS* (Viklund *et al.* 2008) (<http://octopus.cbr.su.se/index.php>) y *TopPRED* (Heijne 1992) (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>).

### **3. Estudio del dominio transmembrana de la proteína Rot1**

---

#### **Inserción de la proteína Rot1 en la membrana del retículo endoplásmico**

Rot1 es una proteína esencial de *Saccharomyces cerevisiae* que se asocia preferentemente a la membrana perinuclear del retículo endoplásmico. La secuencia completa de la proteína se analizó mediante diferentes programas informáticos que se encuentran disponibles en Internet y que predicen la presencia de dominios transmembrana y su topología. Como se observa en la Tabla 3.1, los resultados obtenidos demuestran una amplia variabilidad entre ellos siendo, por si mismos, ambiguos como para permitir un consenso en cuanto a la secuencia de la región hidrofóbica y a su topología, aunque todos predicen la presencia de un dominio transmembrana en su extremo C-terminal.

**Tabla 3.1 Dominios transmembrana y topologías de la proteína Rot1 predichas por diferentes programas**

Algoritmo	Posición	Secuencia	Topología
DAS	237-252	AIWYISAGMLGVGSLI	
PHDhtm	239-256	WYISAGMLGVGSLLFLAF	ND
MEMSAT3	235-254	SNAIWYISAGMLGVGSLLFL	N-in
MEMSAT-SVM	237-253	AIWYISAGMLGVGSLLF	N-out
TMHMM	232-254	FLTSNAIWYISAGMLGVGSLLFL	N-in
TMPred	238-256	IWYISAGMLGVGSLLFLAF	N-out
$\Delta G$ Predict	237-256	AIWYISAGMLGVGSLLFLAF	
SPOCTOPUS	235-255	SNAIWYISAGMLGVGSLLFLA	N-out
TopPred	236-256	NAIWYISAGMLGVGSLLFLAF	N-out

Previamente en nuestro grupo, se había determinado la asociación de la proteína a la membrana del retículo endoplásmico (Juanes *et al.* 2008), pero para establecer de forma concluyente la correcta topología de la proteína y diferenciar entre una asociación periférica o transmembrana de la región hidrofóbica de Rot1, se evaluó la capacidad de inserción de la región C-terminal de la proteína fuera de su contexto natural. Para ello se utilizó un sistema de transcripción/traducción *in vitro* basado en la proteína Lep (*Leader peptidase*) de *E. coli*, que permite determinar de forma clara la inserción y translocación de segmentos hidrofóbicos en membranas microsomales de retículo endoplásmico (Hessa *et al.* 2005). Este sistema utiliza el translocón como maquinaria molecular para la inserción en membranas biológicas.

Para realizar este ensayo se escogió como fragmento putativo transmembrana de la proteína Rot1, la región predicha por el programa  $\Delta G$  prediction server v1.0 (Hessa *et al.* 2007), disponible en: <http://dgpred.cbr.su.se/>). Este programa genera una predicción del valor de la diferencia de energía libre aparente ( $\Delta G_{app}$ ) de inserción para cada residuo de la secuencia analizada y lo computa, mostrando las regiones más favorables para la inserción en la membrana. Para la proteína Rot1 el programa identificó una única región hidrofóbica comprendida entre los

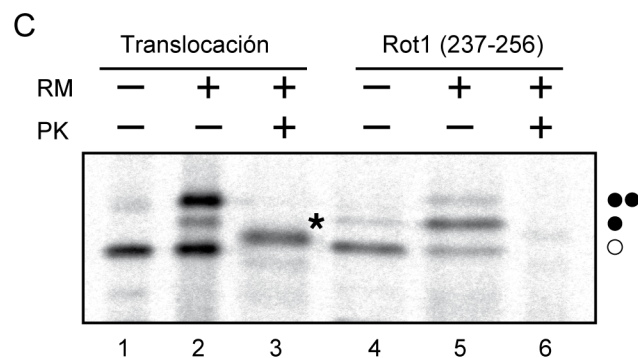
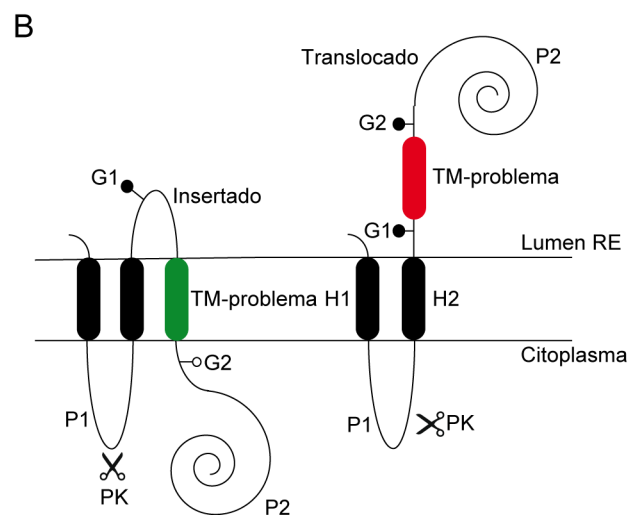


residuos 237-256, ubicada en el extremo C-terminal, con un valor  $\Delta G_{app}$  de -0,66 kcal/mol, indicando que este dominio es el que presenta una mayor probabilidad de inserción en la membrana del retículo endoplásmico (Tabla 3.1; Figura 3.1A).

La proteína de membrana Lep de *E. coli* (Figura 3.1B), que se utilizó como proteína modelo en estos ensayos, tiene dos segmentos transmembrana conectados por una horquilla citoplasmática (dominio P1) y un dominio C-terminal (P2). Lep se inserta en las membranas microsomales con los extremos N- y C- terminales orientados hacia el lumen del retículo endoplásmico. La región objeto de estudio se inserta en el dominio P2, ubicada entre dos dianas de glicosilación G1 y G2, que son empleadas como reporteras en la determinación de la inserción. Debido a que, como se ha mencionado en la Introducción (Ver Introducción, página 25), el dominio activo de la enzima oligosacaril transferasa (OST) se encuentra localizado en el lumen del retículo endoplásmico, la glicosilación de una proteína traducida *in vitro*, indica que la región que presenta la diana de glicosilación se encuentra expuesta al lumen del retículo endoplásmico. Por esta razón, la diana G1 siempre estará glicosilada por su localización luminal, mientras que el sitio G2 solo se podrá glicosilar si el segmento objeto de estudio se transloca a través de la membrana, exponiendo la diana G2 al centro catalítico de la OST (Figura 3.1B).

Una sola glicosilación dará como resultado un incremento en la masa molecular de la proteína en aproximadamente 2.5 kDa con respecto a la masa molecular de la construcción Lep observada en ausencia de microsomas en geles de electroforesis *SDS-PAGE*, y sería indicativo de que la región hidrofóbica ensayada se inserta en la membrana. Una doble glicosilación generaría un cambio de la masa molecular en aproximadamente 5 kDa y sería evidencia que la región hidrofóbica se ha translocado. Además, este ensayo puede completarse mediante la realización de los experimentos de traducción *in vitro* en presencia de

A  
MWSKKFTLKKLILGGYLFQAQKVYCEDESNSIYGTWSSKSNQVFTGPGFYD  
PVDELLIEPSLPGLSYSFTEDGWYEEATYQVSGNPRNPTCPMASLIYQHG  
TYNISENGTLVLNPIEVDGRQLFSDPCNDDGVSTYSRYNQTETTFKEYAVG  
IDPYHGIYTLQLYQYDGTMPQPLYLAYRPPMMLPTETLNPTSSATSTDDP  
SSNKKRSLRSLVRRSLENRHKTNAIKRQNTSFLTSN**AIWYISAGMLGVGS**  
**LLFLAF**<sub>256</sub> <sup>237</sup>



microsomos con la adición de proteinasa K (PK), dado que esta proteasa no puede atravesar las membranas microsomales y digiere solamente la región citoplasmática expuesta produciendo un fragmento resistente a la digestión doblemente glicosilado del dominio P2 cuando el fragmento transmembrana se ha translocado, localizándose en el lumen de los microsomas.

Para comprobar experimentalmente si el dominio transmembrana de Rot1 se inserta en la membrana del retículo endoplásmico, se clonó la región 237-256, predicha anteriormente por el programa *ΔG prediction server v1.0*, en la construcción que lleva el dominio P2 de la proteína Lep y se expresó *in vitro* utilizando aminoácidos marcados radioactivamente, en presencia o ausencia de membranas microsomales derivadas del retículo endoplásmico (RM). En la construcción que lleva el dominio transmembrana de Rot1 se detectó principalmente la forma monoglicosilada correspondiente al sitio G1 (Figura 3.1C, carrera 5), diana que siempre se glicosila por estar ubicada en el lumen del retículo endoplásmico, mientras que las bandas de las formas doblemente glicosiladas o sin glicosilar se detectaron de forma muy minoritaria.

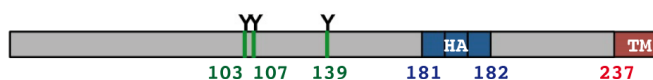
**Figura 3.1. Inserción en la membrana del extremo C-terminal de Rot1.** **A.** Secuencia de aminoácidos de la proteína Rot1, donde se muestra en rojo el potencial dominio transmembrana en el extremo C-terminal predicho por el algoritmo *ΔG Predictor*. **B.** Representación esquemática de la proteína Lep (*Leader peptidase*). La proteína Lep contiene dos hélices transmembrana (H1 y H2) y un dominio luminal C-terminal (P2). Se inserta en las membranas microsomales con los extremos N- y C-terminales orientados hacia el lumen del retículo endoplásmico. La región hidrofóbica problema se localiza en el dominio P2 flanqueada por dos sitios de glicosilación (G1 y G2). **C.** Traducción *in vitro* de las construcciones Lep. La construcción que contiene el dominio transmembrana de Rot1 se transcribió y tradujo en presencia o ausencia de membranas (RM) y proteinasa K (PK) (carreras 4-6). Una región hidrofóbica control se empleó para verificar la traslocación de una secuencia (carreras 1-3). El círculo blanco representa bandas no glicosiladas, uno y dos círculos negros indican respectivamente bandas mono y doblemente glicosiladas y el asterisco muestra el fragmento protegido de la digestión por proteinasa K. Las proteínas fueron marcadas con [<sup>35</sup>S]metionina y detectadas por un detector de radioactividad (ver Materiales y Métodos).

Además, el tratamiento con proteinasa K provocó la degradación de la proteína, sin llegar a detectarse fragmentos glicosilados (Figura 3.1C, carrera 6). Estos resultados indican claramente que la región hidrofóbica C-terminal de Rot1 se inserta íntegramente en la membrana del retículo endoplásmico como un verdadero segmento transmembrana, con una orientación luminal del extremo N-terminal

### Estrategia para el análisis *in vivo* de la proteína Rot1

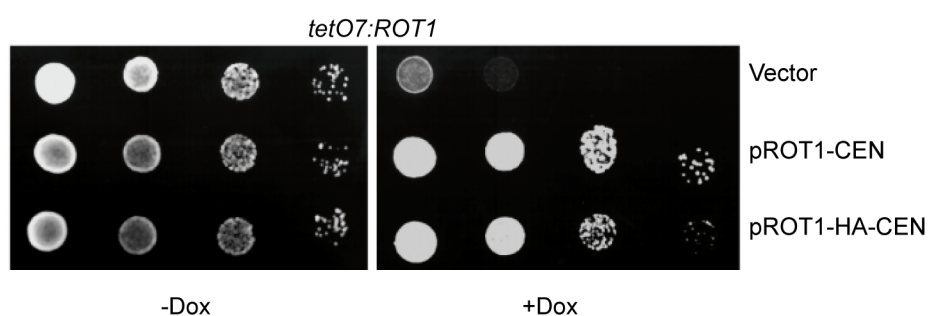
Un objetivo importante de este trabajo fue esclarecer el papel del dominio C-terminal de Rot1 en la función de la proteína en su entorno celular. Para ello, en primer lugar fue necesario diseñar un sistema fácil de detección para la proteína Rot1. Así, se empleó un plásmido que expresa el gen *ROT1* al cual se fusionó el epítipo HA (hemaglutinina) por triplicado entre los aminoácidos 181 y 182 (Figura 3.2). En esta región de la proteína no existen estructuras secundarias organizadas de acuerdo a los programas de predicción de estructuras proteicas.

MWSKKFTLKKLILGGYLFAQKVYCEDESNSIYGTWSSKSNQVFTGPGFYD  
 PVDELLIEPSLPGLSYSFTEDGWYEEATYQVSGNPRNPTCPMASLIYQHG  
 TYNISENGTLVLNPIEVDGRQLFSDPCNDDGVSTYSRYNQTFEKEYAVG  
 IDPYHGIYTLQLYQYDGTMPQPLYLAYRPPMYPYDVPDYAGSYPYDVPDY  
 AYPYDVPDYAMLPTETLNPTSSATSTDDPSSNKKRSLRSLVRRSLENRHK  
 TNAIKRQNTSFLTSNAIWYISAGMLGVGSLFLAF



**Figura 3.2. Esquema de la construcción de la proteína Rot1 etiquetada con HA empleada en los análisis de funcionalidad.** Secuencia de aminoácidos de la proteína Rot1 donde se muestran en verde las dianas de glicosilación (Y) modificadas *in vivo*, en azul las tres copias de la secuencia del epítipo HA insertadas entre los residuos 181 y 182 y en rojo el dominio transmembrana (TM) en el extremo C-terminal.

Dado que Rot1 es una proteína esencial, la funcionalidad de la forma etiquetada de la proteína Rot1 se ensayó empleando la cepa condicional de *S. cerevisiae* *tetO<sub>7</sub>:ROT1*, la cual presenta el gen de la proteína Rot1 bajo el control del promotor *tetO<sub>7</sub>*, que se reprime en presencia de tetraciclinas. Esta cepa por lo tanto, no es capaz de crecer en medio YPD con doxiciclina, un antibiótico del grupo de las tetraciclinas, pero si es transformada con un plásmido que lleve el gen *ROT1* funcional, recupera su fenotipo silvestre. Como se puede ver en la Figura 3.3, la cepa *tetO<sub>7</sub>:ROT1* por sí sola es inviable en medios con doxiciclina, mientras que la cepa que contiene la forma etiquetada de la proteína Rot1-HA es capaz de recuperar el crecimiento en presencia de doxiciclina, al igual que aquella que contiene un plásmido centromérico con el gen *ROT1* sin etiquetar. Estos resultados indican que la proteína Rot1 marcada con HA es completamente funcional.



**Figura 3.3. Funcionalidad de la proteína Rot1 etiquetada con HA.** Diluciones seriadas de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *tetO<sub>7</sub>:ROT1* transformada con el vector, un plásmido centromérico que expresa el gen *ROT1* sin la etiqueta HA y con un plásmido que expresa la proteína etiquetada con HA fueron sembradas en placas de YPD en presencia o ausencia de doxiciclina (10 µg/mL) e incubadas a 28°C durante 3 días.

### **Análisis del dominio transmembrana de la proteína Rot1 a través de inserciones de alaninas**

Trabajos previos de nuestro laboratorio habían descrito que la delección del fragmento transmembrana de Rot1 era letal para la célula (Juanes *et al.* 2008). Para evaluar si la pérdida de función era debida a la deslocalización de la proteína provocada porque la proteína no sea capaz de anclarse a la membrana, se fusionó al mutante de delección Rot1<sup>Δ229-256</sup> una cola de 18 leucinas en el extremo C-terminal produciendo la quimera Rot1<sup>Δ229-256</sup>-18L. La leucina es un aminoácido que tiene una tendencia natural a formar hélices  $\alpha$  y es el residuo más abundante en los segmentos transmembrana (Baeza-Delgado *et al.* 2013). En el trabajo de Juanes *et al.*, 2008, se muestra que, al igual que la proteína silvestre, la forma quimérica Rot1<sup>Δ229-256</sup>-18L se localiza correctamente en la membrana perinuclear, mientras que la proteína mutante Rot1<sup>Δ229-256</sup> se encuentra deslocalizada en el citosol. Sin embargo, la proteína quimérica fue incapaz de mantener el crecimiento de la levadura, indicando que el mutante Rot1<sup>Δ229-256</sup>-18L no es funcional. Estos resultados demuestran claramente que el dominio transmembrana no es simplemente un dominio de anclaje a la membrana sino que también debe tener un papel específico en la función de Rot1.

Con el objetivo de determinar los residuos esenciales del segmento transmembrana de Rot1 se realizó una aproximación bioquímica y molecular analizando una serie de mutantes puntuales en esta región. En un primer paso, con el fin de acotar el fragmento de aminoácidos esencial para la función del dominio transmembrana de la proteína, se realizó un barrido de inserciones de alanina por mutagénesis dirigida (Mingarro *et al.* 1996). Esta técnica permite identificar la localización de las subregiones estructural y funcionalmente importantes dentro de las hélices transmembrana y se basa en el hecho que la inserción de una alanina, un residuo hidrofóbico con una alta tendencia a formar hélices, desplazará 100° los residuos del extremo N-terminal de la secuencia con respecto a los del extremo C-terminal del sitio de inserción. De este modo, se romperán

posibles dominios de interacción hélice-hélice donde estén involucrados los residuos localizados a ambos lados de la inserción. En el caso de que la inserción de Ala quede fuera de la secuencia crítica de la hélice no se observaran cambios significativos respecto a la cepa salvaje. Por lo tanto, sobre el vector que contiene la proteína Rot1-HA se insertaron alaninas a lo largo de diferentes posiciones del fragmento C-terminal mediante mutagénesis dirigida (Tabla 3.2).

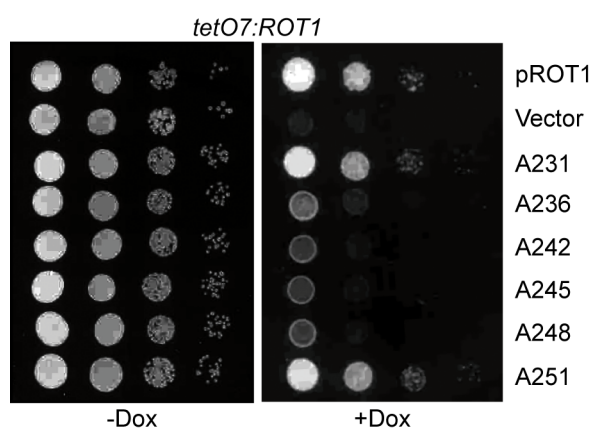
**Tabla 3.2. Mutantes de inserciones de alanina del fragmento transmembrana de Rot1**

Inserción	Secuencia de residuos del dominio transmembrana de Rot1
<b>Rot1</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGVGSLFLAF
<b>A231</b>	S <b>A</b> FLTSNAIWYISAGMLGVGSLFLAF
<b>A236</b>	SFLTSN <b>A</b> AIWYISAGMLGVGSLFLAF
<b>A242</b>	SFLTSNAIWYI <b>A</b> SAGMLGVGSLFLAF
<b>A245</b>	SFLTSNAIWYISAG <b>A</b> MLGVGSLFLAF
<b>A248</b>	SFLTSNAIWYISAGMLG <b>A</b> VGSLFLAF
<b>A251</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGVGS <b>A</b> LLFLAF

La viabilidad de las células con las formas mutantes de inserciones de alaninas obtenidas fue analizada a través de un ensayo de crecimiento de diluciones seriadas de células en placas con o sin doxiciclina (10 µg/ml) de la cepa condicional *tetO<sub>7</sub>:ROT1* transformada con cada uno de los mutantes. Como se observa en la Figura 3.4, la cepa transformada con los plásmidos que expresan las formas mutantes *ROT1-HA-A236*, *ROT1-HA-A242*, *ROT1-HA-A245* y *ROT1-HA-A248* no recuperaron el defecto de crecimiento de la cepa *tetO<sub>7</sub>:ROT1* en presencia de doxiciclina, lo que indica que estas formas no son funcionales. Por el contrario, los mutantes *ROT1-*

## Resultados

*HA-A231* y *ROT1-HA-A251* si permitieron completamente el crecimiento de la cepa de levadura en presencia de doxiciclina, por lo que se demuestra que la inserción de alaninas en estas posiciones no está afectando la funcionalidad de la proteína Rot1. Estos resultados indican que la región comprendida entre los aminoácidos 231-251 del fragmento transmembrana C-terminal de Rot1 contiene residuos que son esenciales para el correcto funcionamiento de la proteína.



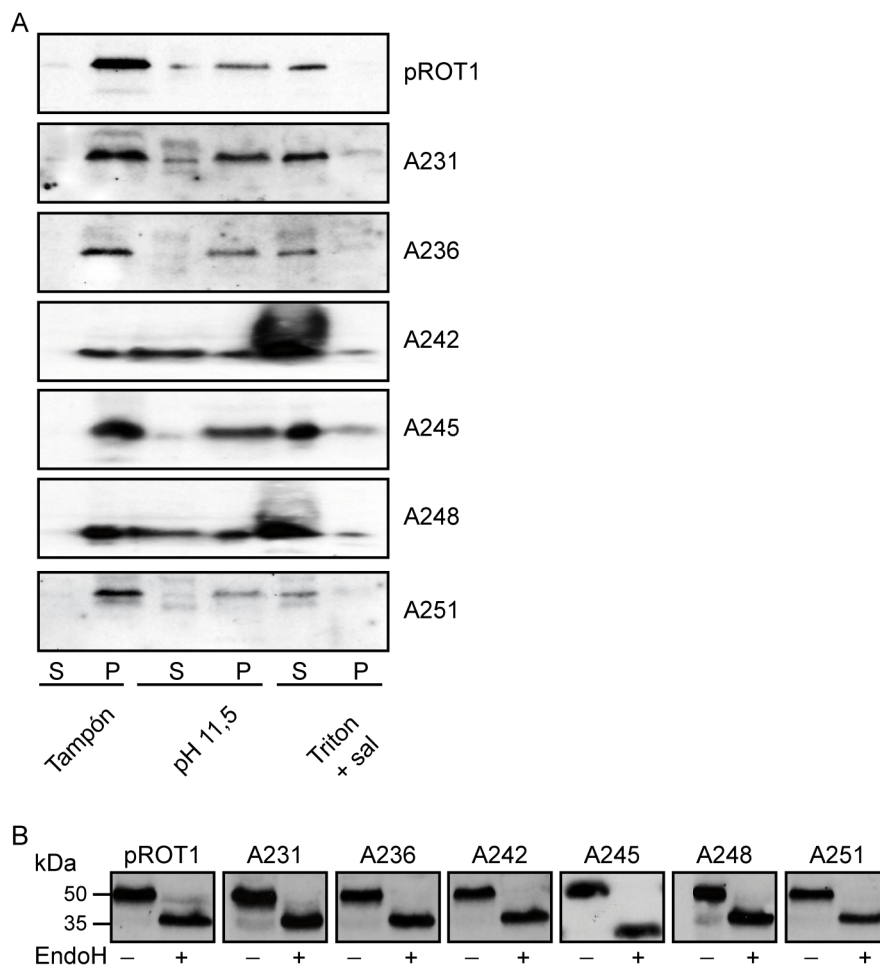
**Figura 3.4. Análisis de viabilidad de las formas mutantes de inserciones de alanina de la proteína Rot1.** Diluciones seriadas de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *tetO7:ROT1* transformada con un plásmido centromérico que expresa el gen *ROT1*, un vector control o las formas mutantes de *ROT1* con las diferentes inserciones de alanina A231, A236, A242, A245, A248 y A251 fueron sembradas en placas de YPD en presencia o ausencia de doxiciclina (10 µg/mL) e incubadas a 28°C durante 3 días.

Es necesario tener en cuenta que la inserción de las alaninas en el dominio transmembrana podría estar afectando su inserción en la membrana y/o su translocación al retículo endoplásmico, produciendo el fenotipo de letalidad observado. Para descartar este hecho se evaluó la



capacidad de los mutantes de asociarse a la membrana reticular a través de un fraccionamiento subcelular. Para esto se utilizaron tratamientos con diferentes efectos sobre la solubilización de las proteínas de membrana (tampón sorbitol, medio alcalino o detergente y sal) y seguidamente se sometieron a ultracentrifugación para separar la fracción insoluble (P) de la fracción soluble (S) (Figura 3.5A). En todos los mutantes de inserciones de alaninas, los tratamientos débiles como el medio alcalino (0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11.5), que permite la liberación de proteínas periféricas y asociadas a las membranas no son capaces de solubilizar eficientemente a la proteína, mientras que con el tratamiento más fuerte (1% Tritón X-100 con 0.5 M NaCl), el cual es capaz de solubilizar proteínas integrales de membrana, las diferentes formas son recuperadas y detectadas en la fracción soluble (Figura 3.5A). Este resultado sugiere que la asociación de la proteína Rot1 a la membrana no se ve afectada por las inserciones de las alaninas.

Además para comprobar si estos mutantes de inserciones de alanina se translocan correctamente al lumen del retículo endoplásmico, se recurrió al hecho de que Rot1 es una proteína que se modifica en las células de levadura mediante N-glicosilación en las posiciones N103, N107 y N139 (Juanes *et al.* 2008) (Figura 3.2). Puesto que, como se ha mencionado anteriormente, en los organismos eucariotas la glicosilación de proteínas ocurre en el lumen del retículo endoplásmico, donde se encuentra el sitio activo de la enzima OST, la presencia de formas glicosiladas de proteínas es un claro indicador de que esta región N-terminal de la proteína ha sido correctamente translocada. Extractos de proteínas de las formas silvestre y mutantes de inserción de alaninas se trataron con endoglicosidasa H como se indica en Materiales y Métodos y se analizó el cambio de movilidad electroforética para determinar si Rot1 se encontraba correctamente glicosilada. Como se observa en la Figura 3.5B, todas las formas presentan claras diferencias en la movilidad electroforética al ser tratadas con endoglicosidasa H, que elimina las moléculas de azúcares de



**Figura 3.5. Localización subcelular de las formas mutantes de inserciones de alanina de la proteína Rot1.** **A.** Extractos proteicos de cultivos de células de la cepa *tetO<sub>7</sub>:ROT1* transformada con los plásmidos mencionados se trataron con tampón de lisis o con tampón con 0.5 M NaCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH11.5) o con 1% Triton X-100 más 0.5 M NaCl. Luego se dividieron los extractos en fracción soluble (S) y pellet (P) por centrifugación a alta velocidad. Los extractos fueron analizados por *western blot*. **B.** Extractos proteicos de cultivos de células mencionadas anteriormente, se incubaron en presencia o ausencia de endoglicosidasa H (50 mU) y se analizaron por *western blot*.

la proteína. Esto indica que todas las formas mutantes de inserción de alaninas en el fragmento transmembrana de Rot1 se glicosilan del mismo modo que la forma silvestre y por lo tanto son capaces de ser dirigidas y orientadas correctamente al retículo endoplásmico.

#### **Identificación de los residuos esenciales del dominio transmembrana de la proteína Rot1 a través de sustituciones por leucina**

De acuerdo con los resultados anteriores, se estableció que la región comprendida entre los residuos 231-251 es necesaria para la función de la proteína Rot1. Para determinar el papel individual de los aminoácidos que componen este dominio se procedió a sustituir todos los residuos, a excepción de los hidrofóbicos alanina, leucina e isoleucina, por el aminoácido leucina, que como se ha mencionado anteriormente, es el residuo más abundante en los segmentos transmembrana y que contribuye a la formación y al mantenimiento de la estabilidad de las hélices transmembrana. Las sustituciones fueron realizadas mediante mutagénesis dirigida en el plásmido que expresa el gen *ROT1-HA*, obteniéndose las formas mutantes que se muestran en la Tabla 3.3.

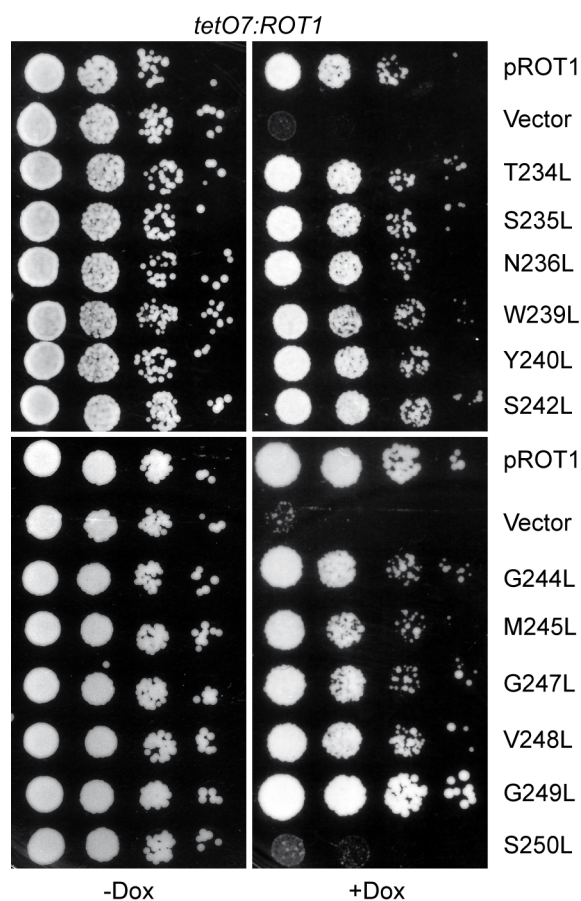
La funcionalidad de las proteínas mutantes se evaluó de nuevo mediante un ensayo de crecimiento en presencia de doxiciclina para determinar la capacidad de suprimir la letalidad de la cepa *tetO<sub>7</sub>:ROT1*. Como se observa en la Figura 3.6, prácticamente todos los mutantes de Rot1 en los que un aminoácido del fragmento transmembrana fue sustituido por leucina fueron capaces de recuperar la viabilidad de la cepa, lo que sugiere que estos residuos no son esenciales para que la proteína funcione correctamente. Sin embargo se encontró una clara excepción en el caso de la serina ubicada en la posición 250. Este residuo demostró ser específicamente importante, puesto que la expresión de la forma mutante *ROT1-HA-S250L* fue totalmente incapaz de permitir el crecimiento de la cepa en presencia de doxiciclina.

**Tabla 3.3. Mutantes de sustituciones a leucina del fragmento transmembrana de Rot1**

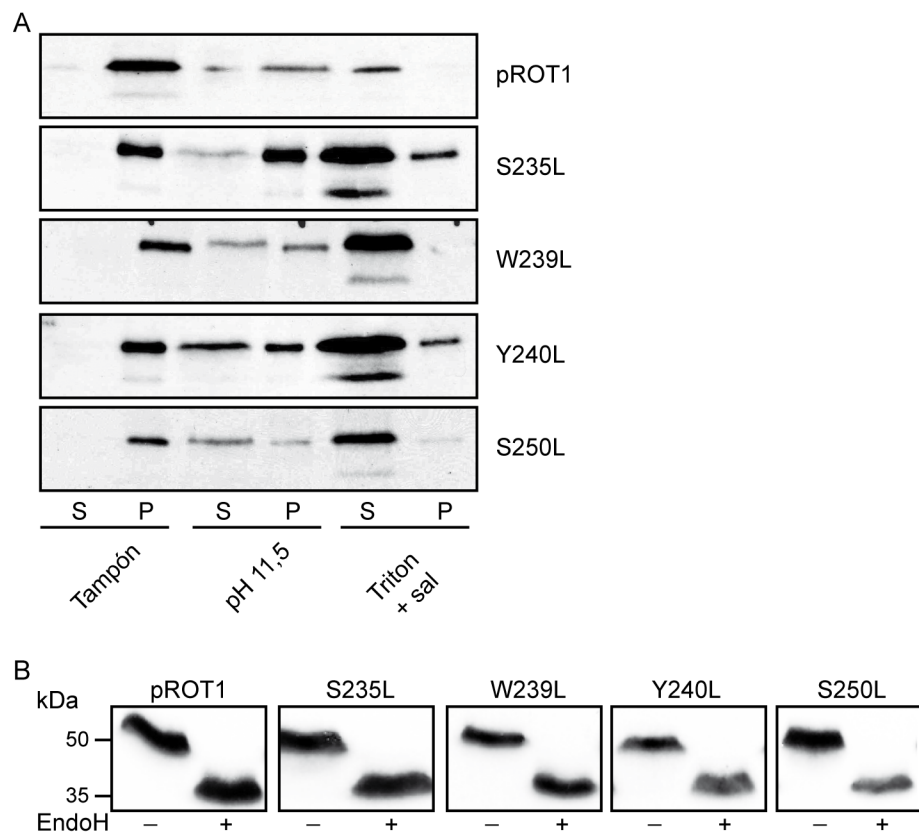
Sustitución	Secuencia de residuos del dominio transmembrana de Rot1
<b>Rot1</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGVGSLLFLAF
<b>T234L</b>	SFL <b>L</b> SNAIWYISAGMLGVGSLLFLAF
<b>S235L</b>	SFLT <b>L</b> NAIWYISAGMLGVGSLLFLAF
<b>N236L</b>	SFLTS <b>L</b> AIWYISAGMLGVGSLLFLAF
<b>W239L</b>	SFLTSNAI <b>L</b> YISAGMLGVGSLLFLAF
<b>Y240L</b>	SFLTSNAIW <b>L</b> ISAGMLGVGSLLFLAF
<b>S242L</b>	SFLTSNAIWYI <b>L</b> AGMLGVGSLLFLAF
<b>G244L</b>	SFLTSNAIWYISA <b>L</b> MLGVGSLLFLAF
<b>M245L</b>	SFLTSNAIWYISAG <b>L</b> LGVSLLFLAF
<b>G247L</b>	SFLTSNAIWYISAGML <b>L</b> VGSLLFLAF
<b>V248L</b>	SFLTSNAIWYISAGMLG <b>L</b> GSLLFLAF
<b>G249L</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGV <b>L</b> SLLFLAF
<b>S250L</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGV <b>L</b> LLFLAF

Una vez determinada la viabilidad celular de las formas mutantes se analizó, al igual que con los mutantes de inserción de alaninas, su asociación a membranas y el estatus de glicosilación de todas las proteínas mutantes, incluyendo la forma mutante Rot1-HA-S250L. El fraccionamiento subcelular indica que la asociación de estas proteínas mutantes a la membrana del retículo endoplásmico no se encuentra modificada por efecto de las sustituciones de los diferentes aminoácidos por leucinas. La Figura 3.7A muestra como ejemplos representativos algunos resultados de estos experimentos. De igual forma, se comprobó el nivel de glicosilación de las formas mutantes. No se encontró ninguna diferencia entre las formas proteicas, ni siquiera en el mutante no funcional, lo que indica que la

proteína se transloca correctamente al lumen del retículo endoplásmico (Figura 3.7B).



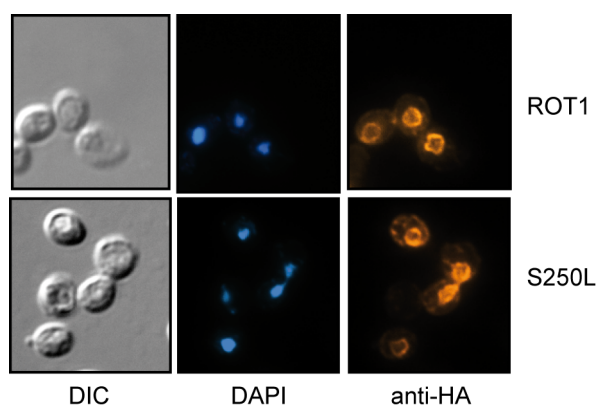
**Figura 3.6. Análisis de viabilidad de las formas mutantes de sustituciones a leucinas de la proteína Rot1.** Diluciones seriadas de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *tetO7:ROT1* transformada con un plásmido centromérico que expresa el gen *ROT1*, un vector control o las formas mutantes de *ROT1* con las diferentes sustituciones de leucinas fueron sembradas en placas de YPD en presencia o ausencia de doxiciclina (10 µg/mL) e incubadas a 28°C durante 3 días.



**Figura 3.7. Localización subcelular de las formas mutantes de inserciones de alanina de la proteína Rot1.** **A.** Extractos proteícos de cultivos de células de la cepa *tetO<sub>7</sub>:ROT1* transformada con algunos plásmidos que expresan formas mutantes de Rot1, se trataron con tampón de lisis o con tampón con 0.5 M NaCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH11.5) o con 1% Triton X-100 más 0.5 M NaCl. Luego se dividieron los extractos en fracción soluble (S) y pellet (P) por centrifugación a alta velocidad. Los extractos fueron analizados por *western blot*. **B.** Extractos proteícos de cultivos de células mencionadas anteriormente, se incubaron en presencia o ausencia de endoglicosidasa H (50 mU) y se analizaron por *western blot*.

Además el análisis mediante inmunofluorescencia indirecta del mutante Rot1-HA-S250L (Figura 3.8) indica que a pesar de ser una proteína no funcional, sí se localiza en la membrana perinuclear del retículo

endoplásmico de manera similar a como lo hace la forma silvestre. Este resultado corrobora el obtenido en los experimentos de fraccionamiento subcelular y demuestra la correcta localización de la proteína mutante Rot1-HA-S250L.



**Figura 3.8. Localización de las forma mutante S250L de la proteína Rot1.** Células de cultivos en fase exponencial de la cepa silvestre transformadas con plásmidos que expresan la versión silvestre y el mutante de sustitución S250L marcadas con el epítipo HA fueron evaluadas por inmunofluorescencia indirecta. Se muestran las imágenes de DIC, tinción con DAPI y fluorescencia indirecta anti-HA.

Conjuntamente, estos resultados apoyan la idea de que el residuo Ser250 del dominio transmembrana no se requiere para la localización y la correcta orientación de la proteína en la membrana perinuclear del retículo endoplásmico, pero debe de estar desempeñando un papel importante para la función de Rot1 dado que en su ausencia la viabilidad celular se ve fuertemente comprometida.

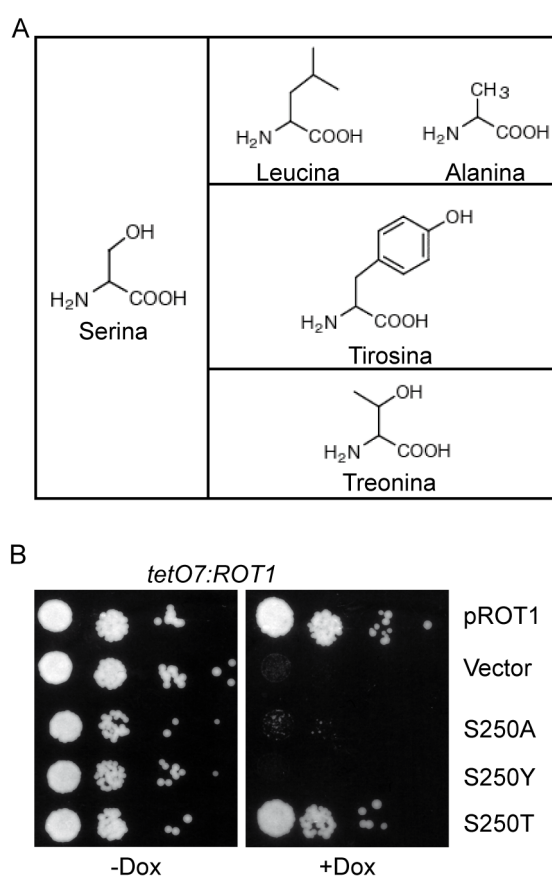
### Análisis del papel del grupo funcional de la cadena lateral del residuo Ser250 en el dominio transmembrana de Rot1

Para profundizar en la determinación de la importancia del residuo Ser250 del segmento transmembrana de la proteína, se procedió a sustituirlo por otros aminoácidos con diferentes grupos funcionales en sus cadenas laterales (Tabla 3.4). Primero, se planteó la posibilidad de que la pérdida de función del mutante S250L fuera provocada por la cadena lateral voluminosa de la leucina, por lo que el residuo Ser250 fue sustituido por alanina, un aminoácido alifático al igual que la leucina pero con una cadena lateral mucho más pequeña (Figura 3.9A). El ensayo de crecimiento celular mostró que la forma mutante *ROT1-HA-S250A* fue incapaz de recuperar el fenotipo de la forma silvestre en presencia de doxiciclina, confirmando que la cadena lateral de la serina es importante para la función de la proteína (Figura 3.9B) y que el resultado obtenido en la sustitución por leucina no era un artefacto producto del tamaño voluminoso de la cadena lateral de este aminoácido.

**Tabla 3.4. Mutantes de sustituciones del residuo Ser250 del fragmento transmembrana de Rot1**

Sustitución	Secuencia de residuos del dominio transmembrana de Rot1
<b>Rot1</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGVGSLLFLAF
<b>S250A</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGVGALLFLAF
<b>S250Y</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGVGYLLFLAF
<b>S250T</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGVGTLLFLAF
<b>S250N</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGVGNLLFLAF
<b>S250D</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGVGDLLFLAF
<b>S250C</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGVGCLLFLAF



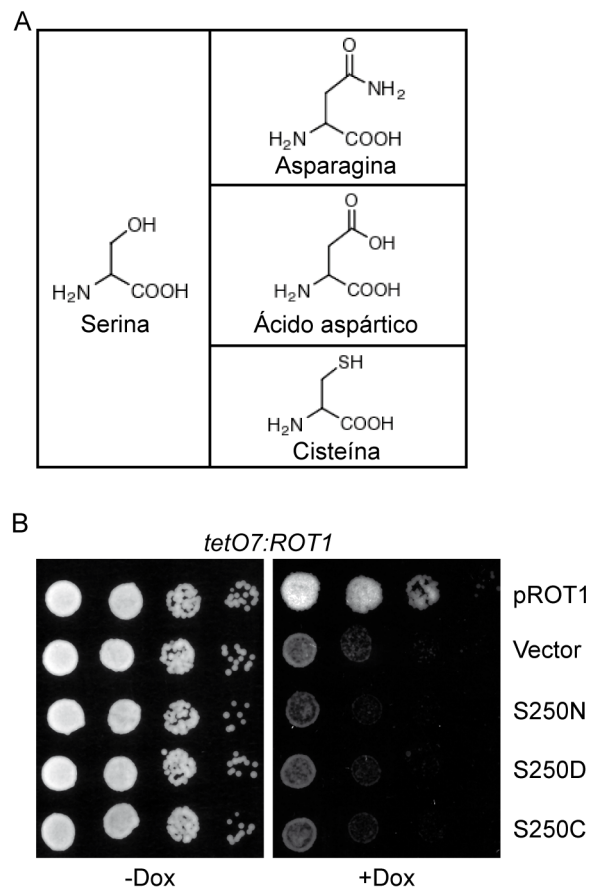


**Figura 3.9. Análisis de viabilidad de las formas mutantes de sustitución del residuo Ser250 de la proteína Rot1. A.** Esquema de los aminoácidos utilizados en la sustitución del residuo Ser250. **B.** Diluciones seriadas de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *tetO7:ROT1* transformada con un plásmido centromérico que expresa el gen *ROT1*, un vector control o las formas mutantes de *ROT1* con las sustituciones S250A, S250Y y S250T, fueron sembradas en placas de YPD en presencia o ausencia de doxiciclina (10 µg/mL) e incubadas a 28°C durante 3 días.

A continuación se procedió a sustituir la Ser250 por otros residuos polares que contengan un grupo hidroxilo en su cadena lateral, ya que se ha descrito que este grupo puede formar puentes de hidrógeno que contribuyen a la estabilización de las interacciones entre hélices

transmembrana (Adamian & Liang 2002); (North *et al.* 2006). Para comprobar esto se sustituyó la Ser250 por tirosina y treonina, aminoácidos que presentan un grupo hidroxilo en sus cadenas laterales (Figura 3.9A). La mutación S250Y no fue capaz de restituir la capacidad de crecimiento de la cepa *tetO<sub>7</sub>:ROT1* en presencia de doxiciclina. Sin embargo, el cambio conservativo S250T presentó un fenotipo de crecimiento similar al de la forma silvestre de Rot1 (Figura 3.9B). Estos resultados indican que el grupo hidroxilo es esencial para la función de la proteína Rot1, aunque se necesita una cadena lateral poco voluminosa puesto que la tirosina, al poseer un anillo aromático podría impedir el correcto empaquetamiento de la proteína, posiblemente induciendo problemas estéricos.

La importancia del grupo hidroxilo en la funcionalidad de la proteína, indica que posiblemente se esté formando un puente de hidrógeno entre el residuo Ser250 y otros residuos de la hélice transmembrana de otras moléculas de Rot1 o de otras proteínas. Dado que han sido descritos otros residuos capaces de formar puentes de hidrógeno en fragmentos transmembrana (Dawson *et al.* 2002; Curran & Engelman 2003), se decidió analizar otros grupos funcionales. Los aminoácidos más comúnmente implicados en este tipo de interacciones son la asparagina, el ácido aspártico y la cisteína, que presentan un grupo amida (-NH<sub>2</sub>), un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo sulfhidrilo (-SH) respectivamente en sus cadenas laterales (Figura 3.10A). Para llevar a cabo estos experimentos se construyeron por mutagénesis dirigida las formas mutantes *ROT1-HA-S250N*, *ROT1-HA-S250D* y *ROT1-HA-S250C* (Tabla 3.4) y se analizaron mediante ensayos de viabilidad celular en placas con doxiciclina. Como se observa en la Figura 3.10B, ninguna de las formas mutantes fue capaz de recuperar el fenotipo silvestre de la cepa, indicando que la sola presencia de un grupo polar no es suficiente para llevar a cabo la función del fragmento transmembrana y que es necesaria de forma específica la presencia del grupo hidroxilo (-OH).



**Figura 3.10. Análisis de viabilidad de las formas mutantes de sustitución del residuo Ser250 de la proteína Rot1.** **A.** Esquema de los aminoácidos utilizados en las mutagénesis dirigida. **B.** Diluciones seriadas de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *tetO7:ROT1* transformada con un plásmido centromérico que expresa el gen *ROT1*, un vector control o las formas mutantes de *ROT1* con las sustituciones S250N, S250D y S250C, fueron sembradas en placas de YPD en presencia o ausencia de doxiciclina (10 µg/mL) e incubadas a 28°C durante 3 días.

### Análisis de la posición del residuo Ser250 dentro del fragmento transmembrana de la proteína Rot1

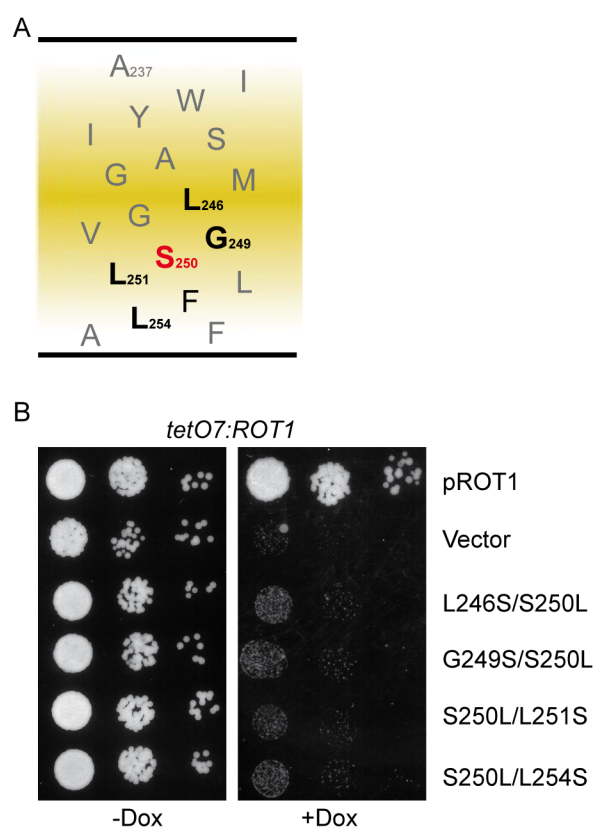
Después de demostrar que el grupo hidroxilo es esencial para la viabilidad celular, se estudió si el residuo Ser250 debe estar localizado en una posición particular dentro del fragmento transmembrana de la proteína. Para esto se construyeron dobles mutantes que no cambiaran la composición aminoacídica del segmento transmembrana, desplazando el residuo de serina a distintas posiciones dentro de la hélice transmembrana (Tabla 3.5; Figura 3.11A). El intercambio posicional del residuo Ser250 con cualquiera de los residuos adyacentes a éste, (Gly249 o Leu251) afectó de nuevo la viabilidad celular, ya que no se recuperó el fenotipo de crecimiento de la cepa *tetO<sub>7</sub>:ROT1* en presencia de doxiciclina cuando se analizaron estos mutantes (Figura 3.11B).

**Tabla 3.5. Mutantes de sustitución del residuo Ser250 del fragmento transmembrana de Rot1**

Sustituciones	Secuencia de residuos del dominio transmembrana de Rot1
<b>Rot1 silvestre</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGVG <b>S</b> LLFLAF
<b>G249S/S250G</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGV <b>S</b> G <b>L</b> LLFLAF
<b>S250L/L251S</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGV <b>G</b> L <b>S</b> LLFLAF
<b>L246S/S250L</b>	SFLTSNAIWYISAGM <b>S</b> GV <b>G</b> LLFLAF
<b>S250L/L254S</b>	SFLTSNAIWYISAGMLGV <b>G</b> LL <b>L</b> F <b>S</b> AF

A continuación se evaluó el efecto del desplazamiento del residuo Ser250 una vuelta de hélice hacia arriba o hacia abajo de la posición original de la serina, teniendo en cuenta que una hélice alfa canónica tiene aproximadamente 3,6 residuos por vuelta. Se intercambió la Ser250 con los residuos Leu246 y Leu254, generándose los mutantes *ROT1-HA-*

*L246S/S250L* y *ROT1-HA-S250L/L254S* (Tabla 3.5; Figura 3.11A). Ninguno de estos mutantes en los que no se altera la composición de aminoácidos, permitió el crecimiento de la cepa en presencia de doxiciclina y por tanto se puede concluir que las proteínas mutantes no son funcionales (Figura 3.11B).



**Figura 3.11. Análisis de viabilidad de las formas mutantes del residuo Ser250 de la proteína Rot1.** **A.** Residuos mutados en la hélice transmembrana de Rot1 mapeados en un diagrama esquemático. El residuo Ser250 esencial se muestra en rojo y los residuos mutados en negrita. La región hidrofóbica de la membrana se representa en amarillo. **B.** Diluciones seriadas de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *tetO7:ROT1* transformada con un plásmido centromérico que expresa el gen *ROT1*, un vector control o las formas mutantes de *ROT1*, fueron sembradas en placas de YPD en presencia o ausencia de doxiciclina (10 µg/mL) e incubadas a 28°C durante 3 días.

Analizados juntos, todos estos resultados sugieren que la ubicación precisa de la cadena lateral de la serina dentro de la zona hidrofóbica de la membrana es necesaria para la viabilidad celular. Por lo tanto, el grupo hidroxilo de la serina debe estar localizado exactamente en la posición 250 para que la proteína Rot1 sea funcional.

#### **Análisis de secuencias homólogas del fragmento transmembrana de la proteína Rot1**

Los resultados encontrados hasta ahora resaltan el hecho de que el residuo Ser250 cumpla una función importante en la proteína, y que es vital su ubicación específica dentro del dominio transmembrana, así como las propiedades químicas de su grupo funcional. Rot1 es una proteína que ha sido caracterizada en *S. cerevisiae*, pero se han determinado formas homólogas en otras especies de levaduras. Para determinar si este residuo se encuentra conservado en diferentes especies de levadura, se analizaron las secuencias de proteínas homólogas de Rot1 en 28 especies empleando el programa *ΔG prediction server v1.0* (Hessa *et al.* 2007) y se alinearon los dominios transmembrana encontrados utilizando el programa *MEGA 5.2* (Tamura *et al.* 2011), disponible en <http://megasoftware.net/>.

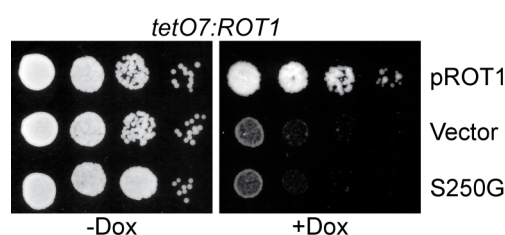
Los alineamientos de las diferentes secuencias muestran que la serina en la posición 250 es un residuo muy conservado, ya que en 19 de las 23 secuencias analizadas existe una serina en la misma posición, dando una identidad del 82% (Tabla 3.6). Además en la secuencia de *Ashbya gossypii* en la posición de la serina existe un residuo de treonina, que, como se ha demostrado en el presente trabajo, es capaz de cumplir la función de la serina dentro de la proteína Rot1 (Figura 3.9).

En este análisis llama la atención que en dos especies de levadura, *Yarrowia lipolytica* y *Ogatea parapolymorpha*, se encuentra una glicina en la posición correspondiente a la serina que se ha determinado como esencial. Por lo tanto se decidió ensayar el efecto de cambiar el residuo Ser250 por glicina en la proteína Rot1. Sin embargo, al hacer los ensayos de viabilidad

con el mutante *ROT1-HA-S250G*, se observó que esta forma mutante no era capaz de recuperar el fenotipo silvestre (Figura 3.12).

**Tabla 3.6. Alineamiento del fragmento transmembrana de proteínas homologas de Rot1**

<b>Especie de levadura</b>	<b>Secuencia TM homologa de Rot1</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	---AIWYISAGMLGVGS-LLFLAF-
<i>Ashbya gossypii</i>	-AAFYWWCSAGVIAAGT-VLFFMV-
<i>Candida albicans</i>	---KIWWSSVFCLALAS-SYFFL--
<i>Candida glabrata</i>	-AAFVWYTSFFLVGAGS-LIFIS--
<i>Candida orthopsilosis</i>	LFDMYWWMSVGCLGLAS-GFFFLLK-
<i>Candida parapsilosis</i>	---MYWWISVGCLGLAS-GFFFLLK-
<i>Candida tenuis</i>	---LYWYMSATLLGGAA-VFAFF--
<i>Candida tropicalis</i>	-FDRYWWGSVVCLCLAS-SYFFLVR
<i>Eremothecium cymbalariae</i>	--ALCWKIGASLIGLGS-LIFFLV-
<i>Kazachstania africana</i>	---TLWYASATMLGIGS-IVFLAC-
<i>Kluyveromyces lactis</i>	---KYWWGSLALIGVGS-IAFLL--
<i>Komagataella pastoris</i>	-YTLWWWLGAILMGAGS-TIYFLY-
<i>Lachancea thermotolerans</i>	-AAAYWWT SVGLIAFGS-AVFFVF-
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	---KYWWFSVACLGLGS-AYMFL--
<i>Ogataea parapolyomorpha</i>	-YDLLWYVSIAMILVGLMVWR---
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	---TIWWVGLGLIAIGS-IGYLVV-
<i>Spathaspora passalidarum</i>	---KYWWISVGCLGLAS-AYLFL--
<i>Tetrapisispora blattae</i>	---IFWYISTGMLCLGS-IIFLLS-
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	---MFWYLSAGMIGVGS-LVFLS--
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	---YLWYVCTGVIGVGS-ALFLFS-
<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	---FWWWT SVGLVSVGS-LSYFFL-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	---LWWFG-VSMIAAGG-AGWYFL-
<i>Zygosaccharomyces rouxi</i>	---LVWYLSAGMIGVGS-VVFLS--



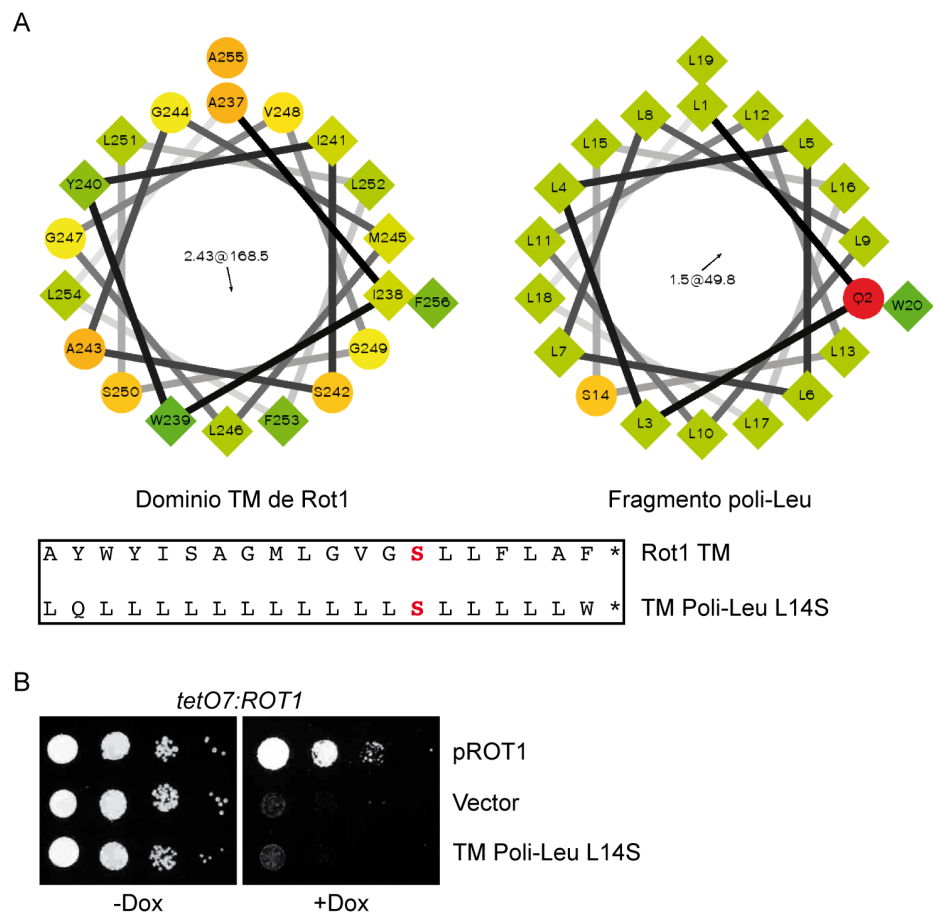
**Figura 3.12. Análisis de viabilidad de la forma mutante de sustitución del residuo Ser250 de la proteína Rot1.** Diluciones seriadas de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *tetO7:ROT1* transformada con un plásmido centromérico que expresa el gen *ROT1*, un vector control o la forma mutante de *ROT1* con la sustitución S250G fueron sembradas en placas de YPD en presencia o ausencia de doxiciclina (10 µg/mL) e incubadas a 28°C durante 3 días

### Influencia del esqueleto transmembrana de la proteína Rot1 en el papel del residuo Ser250

Como se ha mencionado anteriormente, al reemplazar el fragmento transmembrana de Rot1 por una cola de polileucinas, ésta es capaz de anclarse a la membrana del retículo endoplasmático pero no de recuperar la viabilidad celular. Puesto que el residuo Ser250 ha demostrado ser el único aminoácido esencial en este dominio, se decidió estudiar la posibilidad de que al introducir este residuo en la posición adecuada dentro del segmento de polileucinas de la quimera, ésta recuperara su función. Para esto se realizó la sustitución de una leucina por serina sobre el plásmido *pROT1*<sup>A229-256-18L</sup>, obteniéndose el mutante mostrado en la Figura 3.13A. Al introducir esta forma mutante de Rot1 en la cepa *tetO7:ROT1*, no se observó recuperación del crecimiento de las células en placas de doxiciclina, por lo que se deduce que la sola presencia del residuo serina en un segmento de polileucinas no es suficiente para obtener una forma funcional de la proteína y que la serina necesita del entorno que le ofrecen los demás residuos del segmento hidrofóbico para que pueda llevar a cabo las posibles interacciones en las que esté involucrada. Si bien se reconoce que no se



puede descartar la posibilidad que el residuo de serina no se encuentre en la posición exacta dentro de la hélice  $\alpha$  de polileucinas.



**Figura 3.13. Análisis de viabilidad de la forma mutante de la quimera Rot1 <sup>$\Delta$ 229-256-18L</sup>.** **A.** Diagrama esquemático de las hélices  $\alpha$  de Rot1 (izquierda) y el fragmento poli-Leu (derecha) donde se muestra la ubicación espacial del residuo Leu14 sustituido por la Ser250. En el panel inferior se muestran las secuencias aminoacídicas del fragmento transmembrana silvestre de Rot1 y de la cola de polileucinas de la quimera Rot1 <sup>$\Delta$ 229-256-18L</sup> mutante. **B.** Diluciones seriadas de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *tetO7:ROT1* transformada con un plásmido centromérico que expresa el gen *ROT1*, un vector control o la forma mutante de *ROT1* con la sustitución L14S fueron sembradas en placas de YPD en presencia o ausencia de doxiciclina (10  $\mu$ g/mL) e incubadas a 28°C durante 3 días.



## 4. Señalización de la proteína Rot1 al retículo endoplásmico

---

En nuestro grupo, mediante experimentos de expresión condicional de genes, se demostró que Rot1 es una proteína que se dirige al retículo endoplásmico a través de un mecanismo postraduccional (Juanes *et al.* 2008). Además, como se mencionó anteriormente (ver Introducción, Figura 1.9) en la clasificación de las proteínas de membrana de acuerdo a su topología, Rot1 no encaja completamente en ninguno de los grupos de proteína de membrana descritos, puesto que su señal de localización no se encuentra en el dominio N-terminal (Juanes *et al.* 2008) y su segmento transmembrana se localiza en el extremo C-terminal, una distribución estructural diferente a la que se observa para las proteínas del tipo III. Considerando todos estos datos, se puede afirmar que Rot1 es una proteína atípica por lo que respecta a su señalización y topología. Se decidió por tanto identificar cuales son las secuencias de la proteína necesarias para su

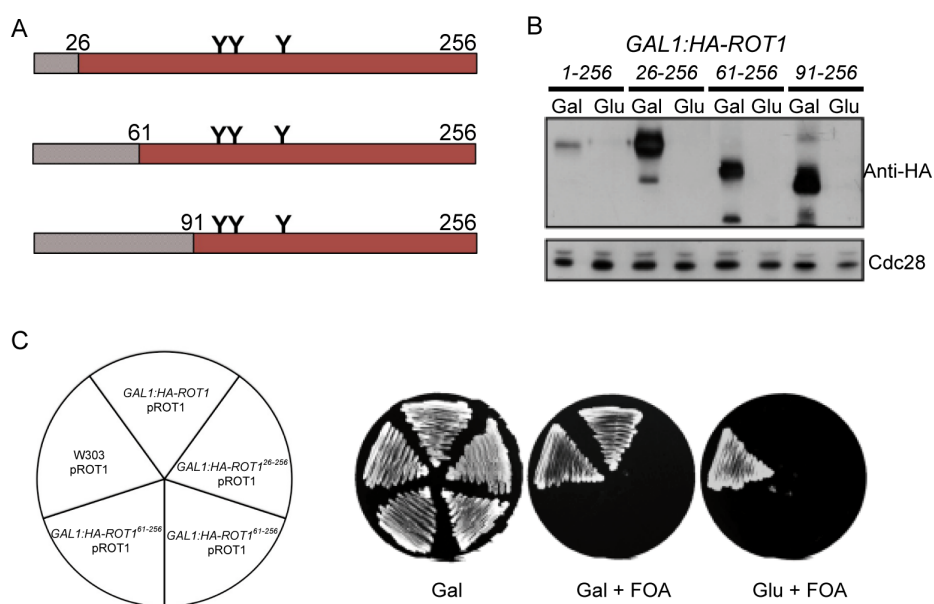
transporte a la membrana del retículo endoplasmático, analizando la localización subcelular de una serie de variantes truncadas de la proteína Rot1 en las que se han deletado distintas regiones de la proteína.

### **Estudio del papel del extremo N-terminal de la proteína Rot1 en la señalización al retículo endoplasmático**

En una primera aproximación para la identificación de las secuencias señales de localización de la proteína en el retículo endoplasmático, se analizó el comportamiento de variantes truncadas de Rot1. Para esto se integró un casete *GAL1:HA* en el *locus* del gen *ROT1* para generar la versión de la proteína completa etiquetada en el extremo N-terminal con el epítipo HA así como diferentes formas truncadas etiquetadas con HA que carecen de las regiones aminoacídicas 1-25 (Rot1-26-256), 1-60 (Rot1-61-256) y 1-90 (Rot1-91-256) (Figura 4.1A). El promotor endógeno del gen fue reemplazado por el condicional *GAL1*, lo que permite la disminución de su tasa de expresión a través del apagado o represión del gen añadiendo glucosa como fuente de carbono al medio. Para comprobar que las proteínas y las variantes truncadas se expresan correctamente se observaron sus niveles en medios en presencia de glucosa o galactosa como fuente de carbono (Figura 4.1B).

La construcción de los mutantes truncados y de la forma completa de la proteína se realizó en células que poseen un plásmido centromérico *URA3* que expresa un gen *ROT1* silvestre ya que previamente se había demostrado en nuestro laboratorio que la delección de la región aminoacídica 1-25 de Rot1 provocaba la inviabilidad de las células (Juanes *et al.* 2008). Como se observa en la Figura 4.1C todas las formas de la proteína crecen en presencia de galactosa como fuente de carbono. Al eliminar el plásmido centromérico que lleva el gen *ROT1* funcional, añadiendo ácido 5-fluorótico (FOA) al medio, solo son capaces de crecer la cepa silvestre y la forma completa de Rot1 que se encuentra bajo el promotor *GAL*, mientras que las células que expresan las formas mutantes Rot1-26-256, Rot1-61-256 y

Rot1-91-256 no pueden crecer. Esto indica que las variantes truncadas afectan negativamente la viabilidad de las células.



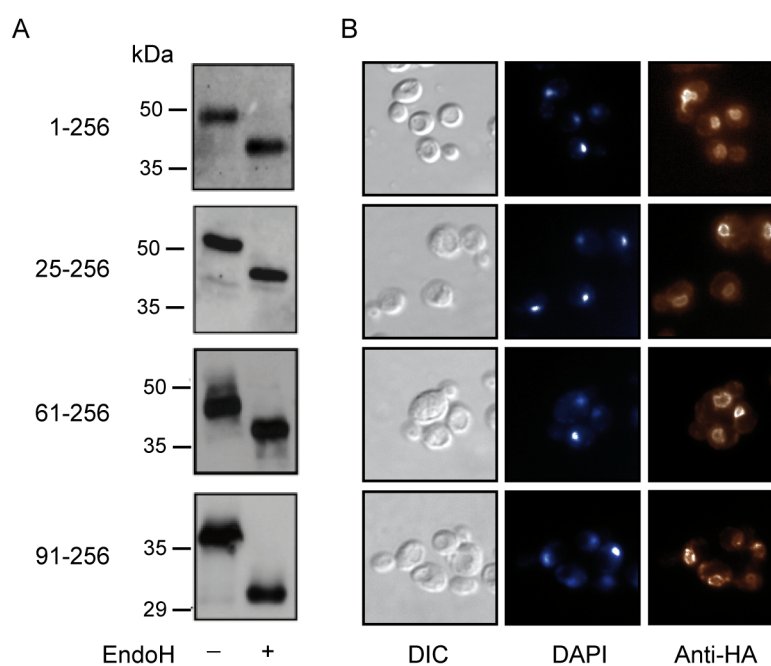
**Figura 4.1. Formas deletéreas en N-terminal de la proteína Rot1.** **A.** Representación esquemática de las formas deletéreas de la proteína Rot1. Las regiones en gris representan el fragmento deletéreo en cada uno de los truncados. Las posiciones donde se encuentran las dianas de glicosilación están representadas con el símbolo (Y). **B.** Análisis por *western blot* de extractos de células que expresan las formas silvestre y truncadas de Rot1 después de crecer en medios con galactosa o glucosa como fuente de carbono. Los niveles de la proteína constitutiva Cdc28 se utilizaron como control de carga. **C.** Las formas silvestre y truncadas de la proteína Rot1 transformadas con un plásmido centromérico *URA3* que expresa el gen silvestre *ROT1* se crecieron en placas de YPGal, y en YPGal e YPD suplementadas con ácido 5-fluorocético (FOA) y se incubaron durante 3 días a 28°C.

El efecto deletéreo de estas deletéreas en el extremo N-terminal podría deberse a la pérdida de una secuencia señal presente en este

dominio que fuera la responsable de la correcta localización de la proteína. Como se ha mencionado anteriormente, Rot1 es una proteína que se glicosila en los residuos N103, N107 y N139, siendo ésta una característica bioquímica útil para establecer la topología de la proteína en la membrana del retículo endoplásmico. Vale la pena recordar que en las células eucariotas, la actividad de N-glicosilación tiene lugar únicamente en el lumen del retículo endoplásmico por acción de la enzima oligosacaril transferasa (OST) asociada al translocón; así la presencia de glicosilaciones en una proteína es evidencia de que ésta ha sido transportada correctamente al retículo endoplásmico.

Cuando los extractos de las células que expresan las variantes de Rot1 truncadas en N-terminal se trataron con endoglicosidasa H, se observó un claro cambio en la movilidad electroforética en todos los casos (Figura 4.2A). Esto revela que las formas truncadas en el extremo N-terminal de la proteína se encuentran N-glicosiladas y que por esto necesariamente estos fragmentos proteicos han sido translocados a través de la membrana del retículo endoplásmico. Estos resultados se reforzaron con las imágenes obtenidas en los análisis de inmunofluorescencia. De manera similar a lo que se observa para la forma silvestre de Rot1, las formas truncadas en N-terminal Rot1-26-256, Rot1-61-256 y Rot1-91-256 se encuentran localizadas en la membrana perinuclear del retículo endoplásmico (Figura 4.2B).

En conjunto estos resultados indican que a pesar de que la secuencia en N-terminal de Rot1 ubicada entre los residuos 1-90 es importante para las funciones esenciales de la proteína, esta región no es indispensable ni para dirigir la proteína al retículo endoplásmico ni para su N-glicosilación. Por lo tanto, en alguna otra región de la proteína entre los residuos 91 a 256 debe encontrarse la señal necesaria para dirigir la proteína a su correcta localización subcelular.



**Figura 4.2. Localización en el retículo endoplásmico de las formas truncadas en el extremo N-terminal de la proteína Rot1.** **A.** Extractos proteicos de cultivos de células de las cepas silvestre y de las que expresan las variantes truncadas Rot1-26-256, Rot1-61-256 y Rot1-91-256, se incubaron en presencia o ausencia de endoglicosidasa H (50 mU) y se analizaron por *western blot*. **B.** Células de cultivos en fase exponencial de las cepas que expresan las formas silvestre de Rot1 y las formas truncadas marcadas con el epítipo HA fueron evaluadas por inmunofluorescencia indirecta. Se muestran las imágenes de DIC (columna izquierda), tinción del núcleo con DAPI (columna central) y fluorescencia indirecta anti-HA (columna derecha).

#### **Estudio del papel del extremo C-terminal de la proteína Rot1 en la señalización al retículo endoplásmico**

Una vez determinado que el dominio N-terminal de Rot1 (residuos del 1-90) no actúa como una secuencia señal de localización e inserción al lumen del retículo endoplásmico, se consideró la posibilidad de que otras

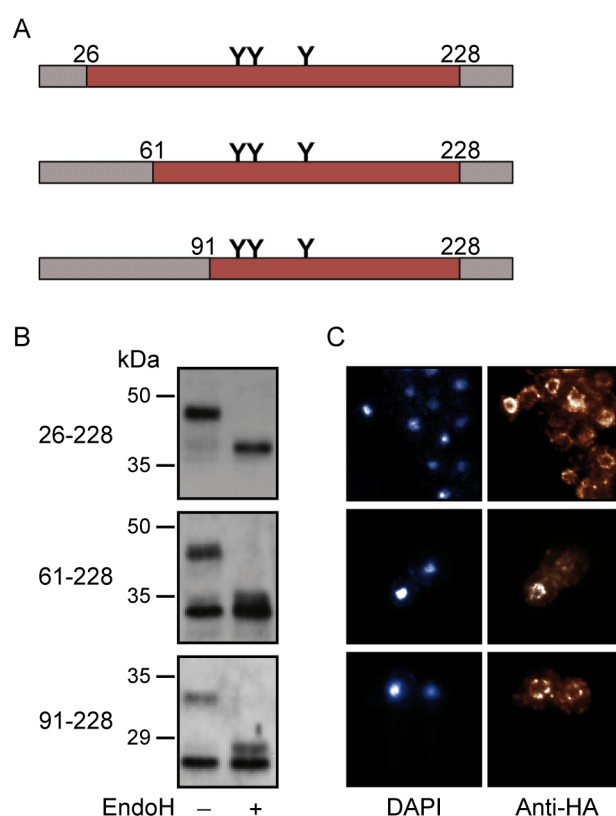
regiones de la proteína sean capaces de realizar esta función. Como se ha descrito anteriormente, los algoritmos computacionales predicen un único dominio hidrofóbico en el extremo C-terminal (Tabla 3.1, pg. 58) demostrado experimentalmente en el capítulo anterior. En nuestro grupo se ha descrito que la eliminación de este dominio transmembrana afecta al anclaje de Rot1 a la membrana pero no a su translocación al lumen del retículo endoplásmico, glicosilándose al igual que la forma silvestre de la proteína (Juanes *et al.* 2008).

Para estudiar el papel de este dominio C-terminal en la señalización al retículo endoplásmico, se deletionó en las formas truncadas en N-terminal descritas en la sección anterior, la región aminoacídica 229-256 para producir las variantes truncadas Rot1-26-228, Rot1-61-228 y Rot1-91-228 (Figura 4.3A). Cuando estas formas truncadas se analizaron después de tratarlas con endoglicosidasa H, se detectó un cambio en la movilidad electroforética en todas las formas mutantes (Figura 4.3B). Esto significa que las proteínas truncadas Rot1-26-228, Rot1-61-228 y Rot1-91-228 están en cierta medida N-glicosiladas, lo que indica que han sido translocadas al lumen del retículo endoplásmico donde se realiza esta modificación. Esta conclusión se reforzó con los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia, los cuales muestran un patrón de tinción para las formas mutantes Rot1-26-228, Rot1-61-228 y Rot1-91-228 en la membrana perinuclear del retículo endoplásmico (Figura 4.3C).

De estos resultados es interesante resaltar que en el caso de las formas truncadas Rot1-61-228 y Rot1-91-228 se observaron dos bandas en el *western blot* en las muestras no tratadas con endoglicosidasa H, las cuales corresponden a formas glicosiladas y no glicosiladas de la proteína, siendo mayoritaria esta última forma en el mutante Rot1-91-228. Esto indica que una fracción importante de las proteínas Rot1-61-228 y Rot1-91-228 no fue modificada, y por lo tanto no translocada al lumen del retículo endoplásmico (Figura 4.3B). No obstante, aunque la falta de modificación esté reflejando un posible defecto en su translocación al lumen del retículo



endoplásmico, no se puede descartar que estas variantes truncadas sean dirigidas correctamente al retículo, pero que por alguna razón desconocida no pueden ser modificadas.



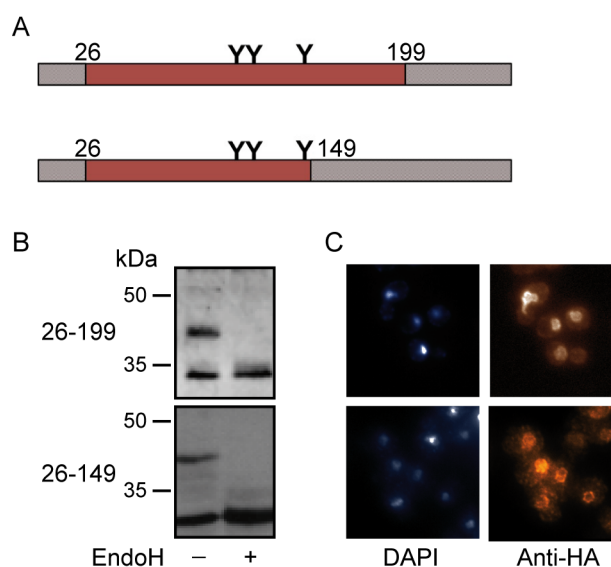
**Figura 4.3. Localización en el retículo endoplásmico de las formas truncadas en el extremo C-terminal de la proteína Rot1.** **A.** Representación esquemática de las formas truncadas de la proteína Rot1. Las regiones en gris representan el fragmento deletado en cada uno de los truncados y las posiciones donde se encuentran las dianas de glicosilación representadas con el símbolo (Y). **B.** Extractos proteicos de cultivos de células de las cepas silvestre y de las que expresan las variantes truncadas Rot1-26-228, Rot1-61-228 y Rot1-91-228, se incubaron en presencia o ausencia de endoglicosidasa H (50 mU) y se analizaron por *western blot*. **C.** Células de cultivos en fase exponencial de las cepas que expresan las formas silvestre de Rot1 y las formas truncadas marcadas con el epítipo HA fueron evaluadas por inmunofluorescencia indirecta. Se muestran las imágenes de DIC (columna izquierda), tinción del núcleo con DAPI (columna central) y fluorescencia indirecta anti-HA (columna derecha).

Los anteriores resultados sugieren que ni el dominio en N-terminal (correspondiente a la región aminoacídica 1-90) ni el dominio C-terminal (correspondiente a la región 228-256) contienen la información requerida para la translocación de la proteína Rot1 al lumen del retículo endoplásmico. No obstante, el fragmento aminoacídico 25-60 es importante para el transporte eficiente de Rot1 al retículo endoplásmico.

#### **Estudio de las regiones internas de la proteína Rot1 en la señalización al retículo endoplásmico**

Para hacer una búsqueda más restrictiva de las secuencias responsables de la localización de la proteína Rot1 al retículo endoplásmico, una deleción mayor desde los residuos 150 ó 200 al 256, se combinó con las formas truncadas en N-terminal de las secciones anteriores. Las formas mutantes obtenidas Rot1-26-199 y Rot1-26-149 (Figura 4.4A) se sometieron al ensayo de digestión por la endoglicosidasa H revelando la presencia de una forma glicosilada de la proteína truncada (Figura 4.4B). Esto indica que una parte importante de la proteína es aún capaz de ser translocada al retículo endoplásmico. Sin embargo debe mencionarse que a diferencia de lo que se observó para la forma truncada Rot1-26-228 (Figura 4.3B), una fracción significativa de las proteínas Rot1-26-199 y Rot1-26-149 se encontraba presente como variante no glicosilada antes de someterla al tratamiento con endoglicosidasa H, lo cual puede indicar que existe una señalización poco eficiente de la proteína al retículo endoplásmico.

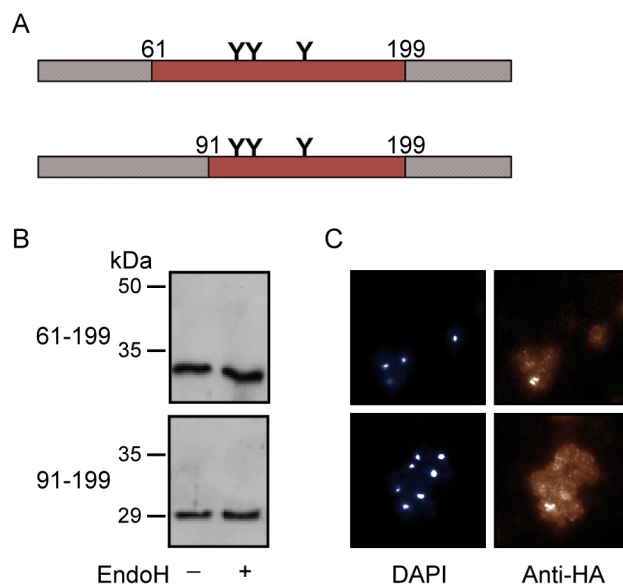
El ensayo de inmunofluorescencia indirecta realizado sobre estas variantes truncadas mostró un patrón de tinción en cierta forma consistente con la localización en la membrana perinuclear del retículo endoplásmico, pero algo más difuso y menos parecido a la ubicación en la membrana reticular que el observado para la variante Rot1-26-228 (comparar Figuras 4.3C y 4.4C). Todos estos datos indican que la eliminación de la región aminoacídica 200-228 presenta un efecto negativo sobre la localización en el retículo endoplásmico de la proteína Rot1.



**Figura 4.4. Localización en el retículo endoplásmico de las formas truncadas en el extremo C-terminal de la proteína Rot1.** **A.** Representación esquemática de las formas delecionadas de la proteína Rot1. Las regiones en gris representan el fragmento delecionado en cada uno de los truncados y las posiciones donde se encuentran las dianas de glicosilación representadas con el símbolo (Y). **B.** Extractos proteicos de cultivos de células de las cepas silvestre y de las que expresan las variantes truncadas Rot1-26-199 y Rot1-26-149, se incubaron en presencia o ausencia de endoglicosidasa H (50 mU) y se analizaron por *western blot*. **C.** Células de cultivos en fase exponencial de las cepas que expresan las formas silvestre de Rot1 y las formas truncadas marcadas con el epítipo HA fueron evaluadas por inmunofluorescencia indirecta. Se muestran las imágenes de DIC (columna izquierda), tinción del núcleo con DAPI (columna central) y fluorescencia indirecta anti-HA (columna derecha).

Finalmente se construyeron también mutantes que combinan la mayor deleción eliminando los residuos 200-256 con los truncados en N-terminal obteniendo las formas mutantes Rot1-61-199 y Rot1-91-199 (Figura 4.5A). Al analizarlas por el tratamiento con endoglicosidasa H no se detectaron las formas glicosiladas de las proteínas truncadas (a diferencia de lo observado en las formas Rot1-61-228 y Rot1-91-228, Figura 4.3B)

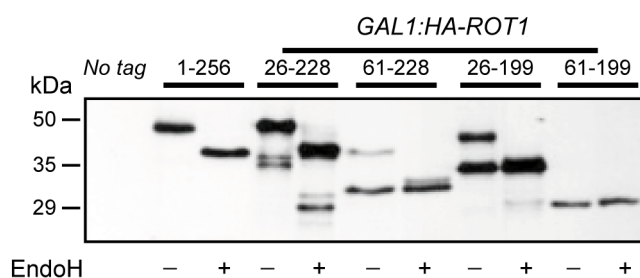
como se puede inferir por la ausencia de alguna variación en la masa molecular de las bandas proteicas después de someterlas al tratamiento con la enzima endoglicosidasa H (Figura 4.5B) indicando que estas formas no son dirigidas al retículo endoplásmico.



**Figura 4.5. Localización en el retículo endoplásmico de las formas truncadas en el extremo C-terminal de la proteína Rot1.** **A.** Representación esquemática de las formas delecionadas de la proteína Rot1. Las regiones en gris representan el fragmento delecionado en cada uno de los truncados y las posiciones donde se encuentran las dianas de glicosilación representadas con el símbolo (Y). **B.** Extractos proteicos de cultivos de células de las cepas silvestre y de las que expresan las variantes truncadas Rot1-61-199 y Rot1-91-199, se incubaron en presencia o ausencia de endoglicosidasa H (50 mU) y se analizaron por *western blot*. **C.** Células de cultivos en fase exponencial de las cepas que expresan las formas silvestre de Rot1 y las formas truncadas marcadas con el epítipo HA fueron evaluadas por inmunofluorescencia indirecta. Se muestran las imágenes de DIC (columna izquierda), tinción del núcleo con DAPI (columna central) y fluorescencia indirecta anti-HA (columna derecha).

Además el ensayo de inmunofluorescencia de estas células mostró que las formas truncadas Rot1-61-199 y Rot1-91-199 presentan un patrón extremadamente difuso y diferente en el cual la señal de la proteína se superpone con el área nuclear (Figura 4.5C), patrón consistente con una deslocalización de la proteína. De este modo, la capacidad de las formas truncadas Rot1-61-228 y Rot1-91-228 de ser transportadas a la membrana del retículo endoplásmico es eliminada en los mutantes Rot1-61-199 y Rot1-91-199, indicando que la región 200–228 participa en el proceso de translocación de la proteína al lumen del retículo endoplásmico.

Es importante resaltar que los mismos resultados descritos para los tratamientos de digestión con endoglicosidasa H fueron obtenidos cuando las formas truncadas de la proteína Rot1 se expresaron a nivel endógeno disminuyendo la concentración de la galactosa en el medio a 0,1%, e igualando el nivel de expresión proteica al de la cepa control *HA-ROT1* (Figura 4.6). Estos resultados descartan la existencia de posibles artefactos producto de la sobreexpresión de las proteínas.



**Figura 4.6. Análisis de la glicosilación de las formas truncadas de Rot1 expresadas a nivel endógeno.** Extractos celulares de las cepas *HA-ROT1* crecidas en medio YPD y *GAL1:HA-ROT1-26-228*, *GAL1:HA-ROT1-61-228*, *GAL1:HA-ROT1-26-199* y *GAL1:HA-ROT1-61-199* que contienen el plásmido centromérico *pROT1-CEN* crecidas en medio sintético suplementado con 0.1% galactosa fueron tratados con 50mU de endoH. Las proteínas fueron analizadas por *western blot* empleando el anticuerpo anti-HA.

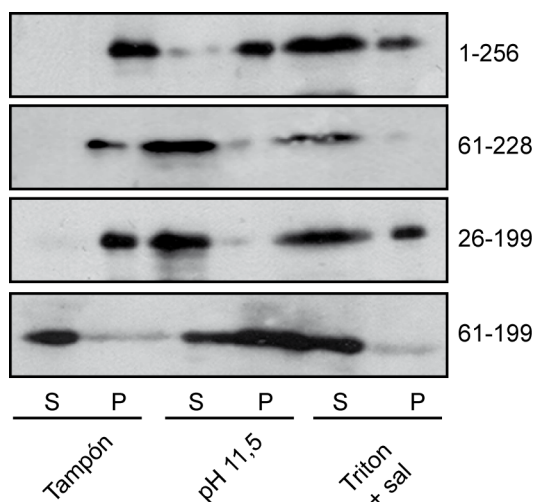
Toda la evidencia aportada por los resultados aquí mostrados, sugiere la existencia de dominios internos en la proteína Rot1 (residuos 26-60 y 200-228) que participan en el direccionamiento de la proteína al lumen del retículo endoplásmico de la célula, lo que dificulta la comprensión de la biogénesis de esta proteína.

#### **Asociación de las formas truncadas de la proteína Rot1 a la membrana del retículo endoplásmico**

Finalmente, se analizó la asociación de las construcciones más significativas de las formas truncadas de Rot1 con la membrana a través de ensayos de fraccionamiento subcelular. Para ello, las células fueron lisadas y los extractos se separaron por centrifugación de alta velocidad (40000 g) en las fracciones pellet (P) y sobrenadante (S) después de someterlas a diferentes tratamientos: incubación en tampón de lisis, tampón carbonato de sodio a pH 11,5 (tratamiento que libera proteínas luminales y proteínas de membrana periféricas) y Triton X-100 más NaCl 0,5 M (tratamiento que libera proteínas de membrana integrales). Las formas truncadas Rot1-61-228 y Rot1-26-199, al igual que la versión silvestre Rot1, se detectaron en la fracción de membranas (pellet) al tratarla con tampón de lisis (Figura 4.7). Sin embargo, las proteínas truncadas Rot1-61-228 y Rot1-26-199 se comportan como proteínas luminales ya que éstas también se extrajeron con el tratamiento alcalino, que desestabiliza las membranas permitiendo la solubilización del contenido luminal, lo cual resulta lógico puesto que estas variantes carecen del dominio C-terminal transmembrana. En el caso de la forma mutante Rot1-61-199, el análisis por fraccionamiento subcelular reveló que una fracción significativa de la proteína era recuperada en la fracción soluble sin necesidad de tratamiento de solubilización alguno.

Todos estos resultados son consistentes con los obtenidos en los ensayos de digestión por endoglicosidasa H y de inmunofluorescencia, otorgando más evidencias experimentales al hecho de que las proteínas Rot1-61-228 y Rot1-26-199, son translocadas al retículo endoplásmico,

mientras que la proteína mutante Rot1-61-199 se encuentra probablemente deslocalizada y no es capaz de dirigirse a la membrana del retículo endoplásmico.



**Figura 4.7. Asociación de las formas truncadas en N-terminal y C-terminal de la proteína Rot1 a las membranas.** Extractos proteicos de cultivos de células de la cepas de mutantes de delección indicadas y silvestre de Rot1 se trataron con tampón de lisis o con tampón con 0.5 M NaCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH11.5) o con 1% Triton X-100 más 0.5 M NaCl. Luego se dividieron los extractos en fracción soluble (S) y pellet (P) por centrifugación a alta velocidad. Los extractos fueron analizados por *western blot* empleando el anticuerpo anti-HA.



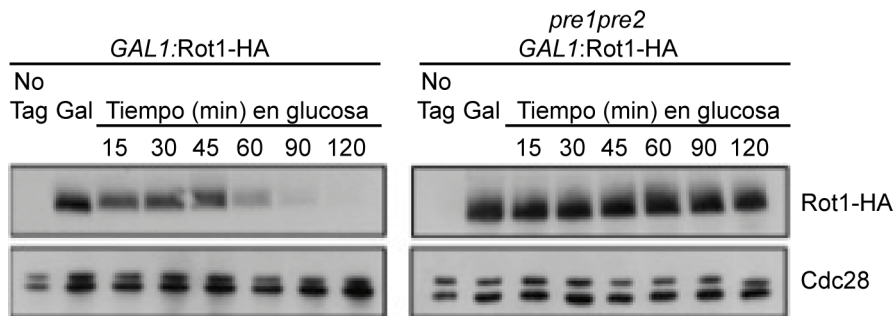


## 5. Estudio de la ruta de degradación de la proteína Rot1

---

Después de analizar las secuencias de la proteína Rot1 implicadas en su localización al retículo endoplásmico, se estudió su mecanismo de degradación. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la proteína Rot1 es una proteína inestable con una vida media corta que se degrada aproximadamente en una hora mediante el sistema ubiquitina-proteasoma. Para evaluar la estabilidad de la proteína Rot1 se utilizaron ensayos de apagado del promotor en una cepa mutante en las subunidades del proteasoma *pre1pre2* (que forman parte de la subunidad 20S y son necesarias para que se estructure el sitio activo) transformada con un plásmido que contiene el gen *GAL1:ROT1-HA*. Como se puede observar, en las células silvestres, la proteína Rot1 se degrada entre los 45-60 min después de apagar el promotor, mientras que los niveles de la proteína se mantienen prácticamente constantes en las células mutantes *pre1pre2*

(Figura 5.1, resultados tomados de (Juanes 2008)). Este resultado indica claramente que Rot1 es degradada por el proteasoma.



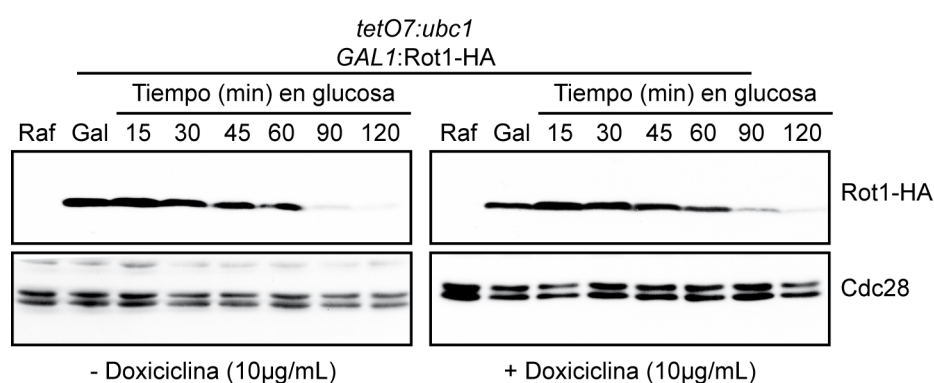
**Figura 5.1. Análisis de la estabilidad de la proteína Rot1 en la cepa mutante en las subunidades del proteasoma *pre1pre2*.** Cultivos de las cepas silvestre (WCG4 $\alpha$ ) y mutante *pre1 pre2* (WCG4-11/22) transformadas con un plásmido que contiene la proteína Rot1-HA bajo el promotor *GAL1* crecidas en galactosa (Gal) durante toda la noche se transfirieron a medio en glucosa. Los niveles de la proteína Rot1 tras la represión del gen *ROT1* por glucosa se analizó por western a los tiempos indicados. Se incluye un extracto obtenido de la cepa silvestre (W303) como control negativo (*no tag*). El nivel de la proteína Cdc28 se muestra como control de carga (Tomado de Juanes 2008).

### Implicación de las enzimas E2 del sistema ERAD en la degradación de la proteína Rot1

Dado que Rot1 es una proteína localizada en el retículo endoplásmico, organelo subcelular donde se encuentra la ruta de degradación del sistema ubiquitina-proteasoma asociada al retículo ERAD (*ER-associated protein degradation*), se decidió averiguar si la proteína Rot1 se degradaba por esta ruta (ver Introducción Fig 1.13, pg. 33). Para evaluar esta hipótesis, se realizaron ensayos de apagado del promotor en cepas mutantes en cada una de las tres enzimas conjugadoras de ubiquitina E2 Ubc1, Ubc6 y Ubc7, que se han descrito que están implicadas en la ruta

ERAD (Hochstrasser 1996; Zattas & Hochstrasser 2015), transformadas con un plásmido que contenía el gen *GAL1: ROT1-HA*.

Puesto que el gen *UBC1* es esencial para la viabilidad celular, se utilizó una cepa mutante condicional que expresa el gen *UBC1* bajo el control del promotor *tetO<sub>7</sub>* regulado por doxiciclina. Al crecer los cultivos celulares en presencia de doxiciclina, lo cual produce células mutantes deficientes en la proteína Ubc1, se observó que la estabilidad de la proteína Rot1 era similar a la de las células silvestres, con una vida media de aproximadamente 1 h, sugiriendo este resultado que la degradación de Rot1 no depende de la proteína Ubc1 (Figura 5.2).

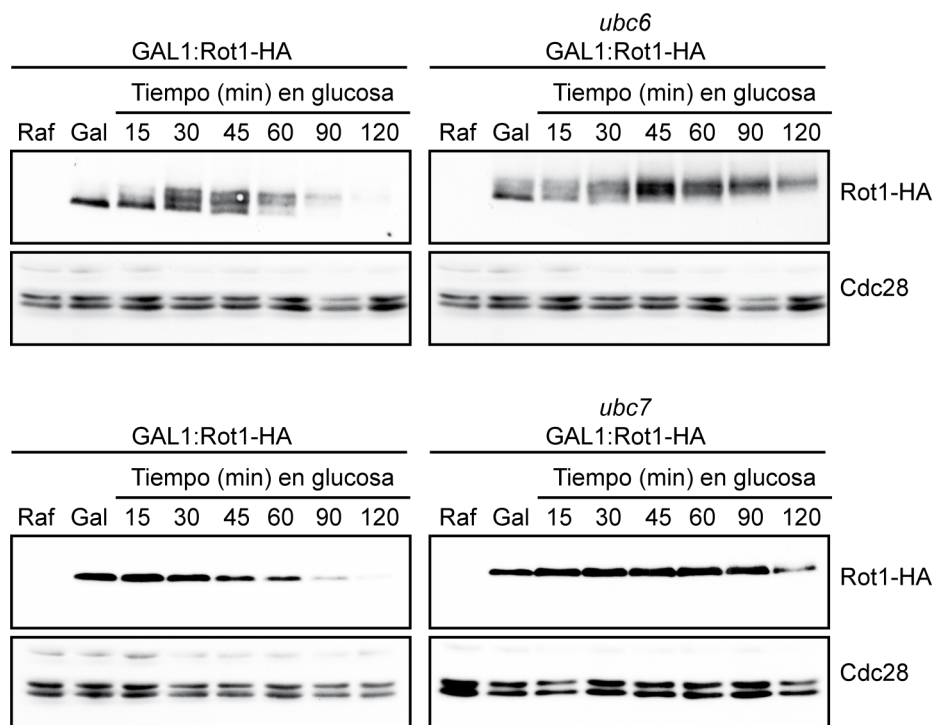


**Figura 5.2. Análisis de la estabilidad de la proteína Rot1 en la cepa mutante en la enzima E2 Ubc1.** Cultivos de la cepa mutante *tetO<sub>7</sub>:ubc1* transformadas con un plásmido que contiene la proteína Rot1-HA bajo el promotor *GAL1* fueron crecidas en presencia o ausencia de doxiciclina (10µg/mL) y en rafinosa (Raf) como fuente de carbono, se sometieron a un pulso de galactosa (Gal) y luego se transfirieron a medio con glucosa. Los niveles de la proteína Rot1 tras la represión del gen *ROT1* por glucosa se analizó por *Western blot* en los tiempos indicados. El nivel de la proteína Cdc28 se muestra como control de carga.

A continuación se evaluó el papel de las otras dos enzimas E2 de la ruta ERAD descritas, Ubc6 y Ubc7. Para esto se compararon las cinéticas

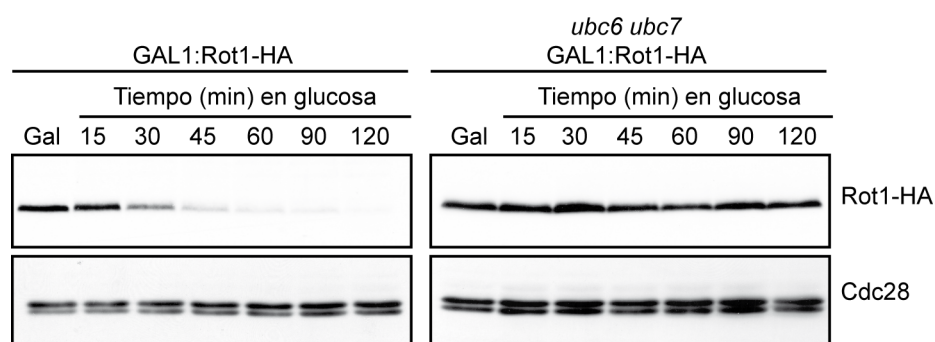
## Resultados

de degradación de la proteína Rot1 en las cepas mutantes *ubc6* y *ubc7*, respecto a las células silvestres. En ambos mutantes se pueden observar ligeras diferencias en cuanto a los niveles de degradación de Rot1, siendo más estable en las cepas mutantes, ya que aún puede detectarse la proteína después de 2 h. Estos resultados sugieren que estas dos enzimas E2 están implicadas en la ruta de degradación de Rot1 (Figura 5.3).



**Figura 5.3. Análisis de la estabilidad de la proteína Rot1 en la cepas mutante en las enzimas E2: Ubc6 y Ubc7.** Cultivos de las cepas mutantes *ubc6* y *ubc7* transformadas con un plásmido que contiene la proteína Rot1-HA bajo el promotor *GAL1* fueron crecidas en rafinosa (Raf) como fuente de carbono. Posteriormente, se sometieron a un pulso de galactosa (Gal) y luego se transfirieron a medio con glucosa. Los niveles de la proteína Rot1 se analizaron por *Western blot* en los tiempos indicados. El nivel de la proteína Cdc28 se muestra como control de carga.

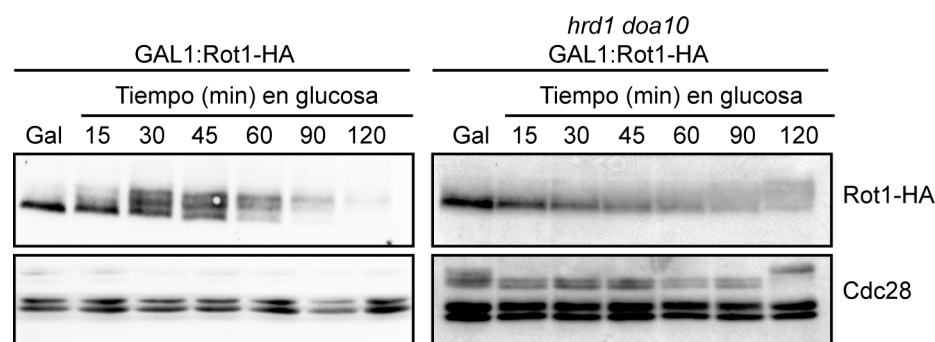
Para investigar si la actividad de estas dos enzimas en la estabilidad de Rot1 puede presentar algún efecto sinérgico, se realizó el mismo experimento pero con el doble mutante *ubc6ubc7*. En las células silvestres, Rot1 es prácticamente indetectable a los 60 min. después de reprimir el promotor *GAL1* (Figura 5.4). En cambio, en las células que son dobles mutantes *ubc6/ubc7*, los niveles de la proteína Rot1 se mantienen claramente estables al menos durante 2h. Este resultado demuestra que Rot1 se degrada utilizando los componentes de la ligasa E2, Ubc6 y/o Ubc7 de la ruta ERAD y sugiere que de alguna forma estas dos enzimas podrían participar en la degradación de Rot1 de manera secuencial con Ubc6 monoubiquitinando a Rot1 para que posteriormente Ubc7 pueda incrementar el número de moléculas de ubiquitina, potenciando su degradación.



**Figura 5.4. Análisis de la estabilidad de la proteína Rot1 en el doble mutante en las enzimas E2: Ubc6/Ubc7.** Cultivos de la cepas mutante *ubc6ubc7* transformada con un plásmido que contiene la proteína Rot1-HA bajo el promotor *GAL1* fueron crecidas en rafinosa como fuente de carbono. Posteriormente, se sometieron a un pulso de galactosa (Gal) y luego se transfirieron a medio con glucosa. Los niveles de la proteína Rot1 se analizaron por *Western blot* en los tiempos indicados. El nivel de la proteína Cdc28 se muestra como control de carga.

### Implicación de las enzimas E3 del sistema ERAD en la degradación de la proteína Rot1

En cuanto a las ubiquitin ligasas E3, en *S. cerevisiae*, existen al menos dos actividades enzimáticas asociadas al sistema ERAD, Hrd1/Der3 y Doa10 (Figura 1.13) (Zattas & Hochstrasser 2015) que deben catalizar la mayor parte de reacciones de ubiquitinación de proteínas en el retículo endoplásmico. Para estudiar la posible participación de estos componentes en la degradación de la proteína Rot1, se utilizó la misma estrategia del apartado anterior, utilizando cepas que carecen de los genes que codifican estas proteínas, para determinar el papel de estas actividades enzimáticas. Se analizó directamente la degradación de Rot1 en la cepa doble mutante *hrd1/doa10* (Figura 5.5).

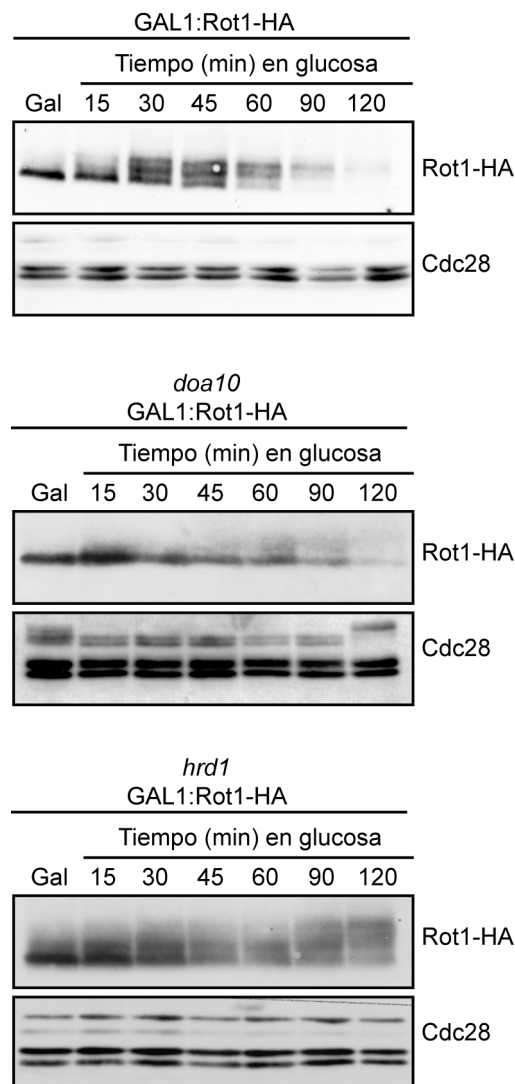


**Figura 5.5. Análisis de la estabilidad de la proteína Rot1 en el doble mutante en las enzimas E3: Hrd1/Doa10.** Cultivos de la cepas mutante *hrd1doa10* transformada con un plásmido que contiene la proteína Rot1-HA bajo el promotor *GAL1* fueron crecidas en rafinosa como fuente de carbono. Posteriormente, se sometieron a un pulso de galactosa (Gal) y luego se transfirieron a medio con glucosa. Los niveles de la proteína Rot1 se analizaron por *Western blot* en los tiempos indicados. El nivel de la proteína Cdc28 se muestra como control de carga.

A diferencia de lo visto en los mutantes E2, los resultados no fueron tan concluyentes como los observados en la cinética de degradación de Rot1 entre las células silvestres y las células mutantes (Figura 5.5). A tiempos de crecimiento largos en el doble mutante se observaron una serie de bandas difusas que no se detectan en la cepa silvestre, un patrón de bandas de menor movilidad electroforética que podrían atribuirse a ubiquitinaciones de la proteína Rot1.

Para determinar cual de las dos E3 del sistema ERAD era responsable de la degradación de Rot1, se repitieron los experimentos utilizando mutantes simples. Tal y como muestra la Figura 5.6, sería Hrd1 la principal ubiquitin ligasa encargada de degradar a Rot1 ya que en el caso del mutante simple *doa10*, no se aprecian cambios significativos en la cinética de degradación respecto a la cepa silvestre. En el caso del mutante *hrd1*, a tiempos largos, se observa el patrón de bandas de menor movilidad electroforética, similar al observado en el doble mutante. Este resultado indicaría que la proteína llega a ubiquitinarse pero no se degrada de forma eficaz.

Con esta evidencia aportada se puede plantear un escenario preliminar del modo en que la proteína Rot1 se degrada a través del mecanismo ERAD. Por un lado, las enzimas del sistema E2 que participan en este proceso, posiblemente de manera cooperativa o redundante son las enzimas Ubc6 y Ubc7. En cuanto a las enzimas del sistema E3, la principal candidata es la proteína Hrd1, mientras que aparentemente la proteína Doa10 no sería necesaria para el proceso de degradación de Rot1.



**Figura 5.6. Análisis de la estabilidad de la proteína Rot1 en las cepas mutantes en las enzimas E3: Hrd1 y Doa10.** Cultivos de las cepas mutantes *hrd1* o *doa10* transformadas con un plásmido que contiene la proteína Rot1-HA bajo el promotor *GAL1* fueron crecidas en rafinosa como fuente de carbono. Posteriormente, se sometieron a un pulso de galactosa (Gal) y luego se transfirieron a medio con glucosa. Los niveles de la proteína Rot1 se analizaron por *Western blot* en los tiempos indicados. El nivel de la proteína Cdc28 se muestra como control de carga.



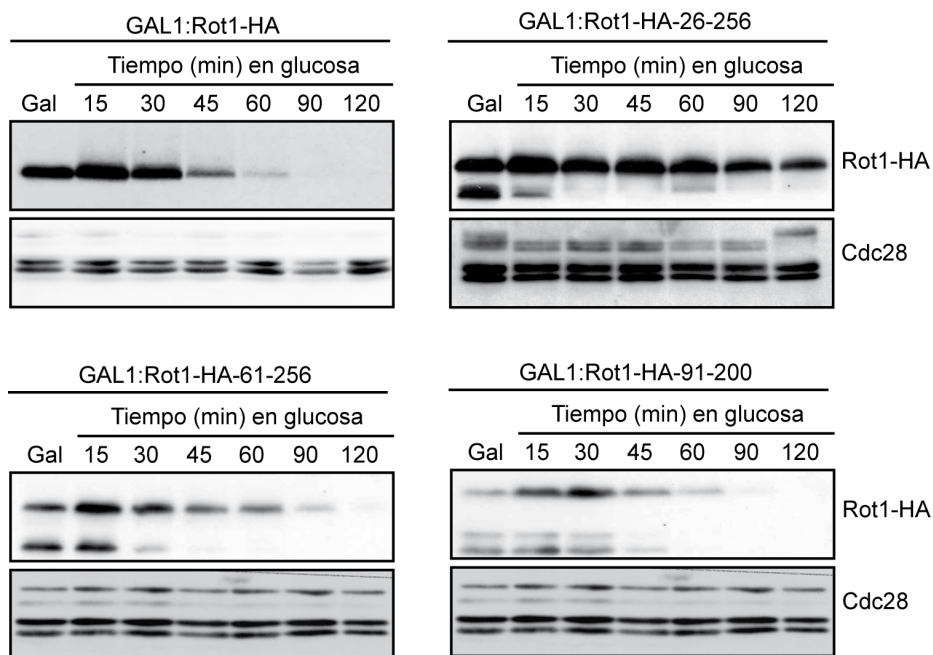
### **Identificación de posibles regiones de la proteína Rot1 implicadas en su degradación**

Otro aspecto que se intentó averiguar en este trabajo fue la localización de la región o regiones dentro de la proteína Rot1 que se encargan de iniciar el proceso de degradación a través de la maquinaria ERAD. Para identificar la localización de estas secuencias de aminoácidos se analizaron algunos de los mutantes de delección empleados anteriormente. Se realizaron de nuevo experimentos de apagado de promotor *GAL1* de las formas truncadas Rot1-26-256, Rot1-61-256 y Rot1-91-256, al igual que de la forma silvestre. Tal como se muestra en la Figura 5.7, la forma mutante Rot1-HA-26-256, que carece de los primeros 25 aminoácidos del extremo N-terminal, es más estable que la forma silvestre, ya que se detecta la banda correspondiente a la proteína Rot1 al menos hasta las 2 horas. Este resultado sugiere que la región N-terminal se comporta como un degrón para la proteína Rot1. Sin embargo, cuando se evaluó la forma truncada Rot1-HA-61-256, la proteína vuelve a comportarse como la forma silvestre, degradándose a los 60 min aproximadamente. Vale la pena recordar que ambos mutantes son capaces de dirigirse al retículo endoplásmico y de glicosilarse correctamente. Puesto que generalmente las secuencias implicadas en la degradación de proteínas se encuentran en los extremos N- y C- terminales, se evaluó el comportamiento del mutante Rot1-HA-91-200, el cual se le delecionó también la región C-terminal. Curiosamente, la proteína sigue siendo inestable y degradándose de manera similar a la forma silvestre.

Aunque no son resultados concluyentes, en principio podrían apuntar a que la secuencia responsable de la degradación de Rot1 es la de la región N-terminal comprendida entre los aminoácidos 1-25. Pero de manera similar a lo observado en el proceso de translocación al retículo endoplásmico, podrían existir otro tipo de marcadores topogénicos, aun no descritos, y que por lo tanto, las formas truncadas 61-256 y 91-200, estarían

## Resultados

adoptando una conformación que revertiera la capacidad de la proteína de ser reconocida nuevamente por la maquinaria de degradación de la célula.



**Figura 5.7. Análisis de la estabilidad de las formas truncadas de la proteína Rot1.** Cultivos de las cepas silvestre y mutantes de delección *GAL1:Rot1-HA-26-256*, *GAL1:Rot1-HA-61-256* y *GAL1:Rot1-HA-91-200*, fueron crecidas en rafinosa como fuente de carbono. Posteriormente, se sometieron a un pulso de galactosa (Gal) y luego se transfirieron a medio con glucosa. Los niveles de la proteína Rot1 se analizaron por *Western blot* en los tiempos indicados. El nivel de la proteína Cdc28 se muestra como control de carga.

## 6. Búsqueda de proteínas que interaccionen con Rot1

---

El estudio de las interacciones entre las proteínas celulares ha contribuido a aportar datos e información relevante sobre su papel en la célula, su implicación en la maquinaria bioquímica, en el metabolismo, etc. Para ello se han desarrollado numerosas técnicas destinadas a establecer este tipo de relaciones, pero que han aportado resultados limitados al aplicarlas a estudios que impliquen proteínas de membrana (Miller *et al.* 2005; Tarassov *et al.* 2008; Costanzo *et al.* 2010). Esto es debido principalmente a su naturaleza hidrofóbica y a su unión a los lípidos de las membranas de los organelos, por lo que requieren del empleo de detergentes para poder ser aisladas de la bicapa lipídica, cuyo uso puede afectar lógicamente la estabilidad de los complejos de los que puedan estar formando parte. Además, algunas proteínas de membrana al encontrarse en medios acuosos no naturales para ellas, tienden a

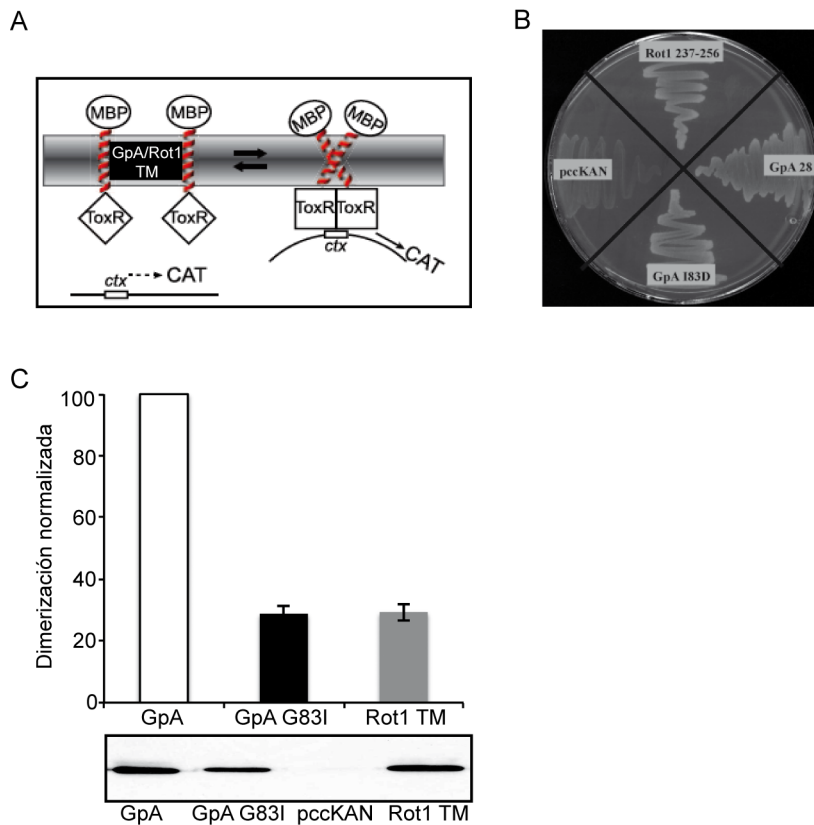
formar precipitados o a desnaturalizarse, de nuevo alterando su hipotética red de interacciones.

Tal y como se ha descrito en la Introducción, la proteína Rot1 se ha relacionado con diversas funciones celulares, pero su papel a nivel molecular no está todavía bien establecido. Por lo tanto se planteó como siguiente objetivo el estudio de las interacciones de la proteína y el papel específico de su dominio transmembrana en ellas. Para ello, en este apartado se utilizaron diferentes enfoques y técnicas con objeto de poder detectar posibles interacciones de la proteína Rot1.

### **Estudio de la capacidad de homo-dimerización del dominio transmembrana de la proteína Rot1**

Generalmente las proteínas de membrana se encuentran organizadas en complejos funcionales, formando en algunos casos homo- o hetero-oligómeros, donde las hélices alfa de los dominios transmembrana juegan un importante papel (Teese & Langosch 2015). Así, dada la importancia observada del dominio transmembrana en la función de Rot1 se decidió analizar la posibilidad de que la proteína Rot1 se encuentre formando homo-oligómeros en las membranas del retículo endoplásmico. Para esto se utilizó el sistema ToxCAT, un ensayo genético desarrollado para estudiar oligomerizaciones hélice-hélice de dominios transmembrana en la membrana interna de *E. coli* (Russ & Engelman 1999). La técnica consiste en la construcción de quimeras compuestas por el factor transcripcional ToxR, el dominio transmembrana objeto de estudio (en este caso el fragmento C-terminal de Rot1) y la proteína de unión a maltosa MBP (*Maltose binding protein*) como dominio de anclaje al periplasma y como indicador de la topología correcta de la construcción (Figura 6.1A). ToxR es un factor transcripcional que necesita dimerizar para activar los genes situados bajo el control del promotor *ctx*, pero que carece de la capacidad de dimerizar por sí mismo. Así pues, en el caso de que ocurra la asociación de los dominios transmembrana, el factor de transcripción ToxR dimerizará y éste a su vez

activará como gen reportero a la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), siendo proporcional, en este ensayo, el nivel de expresión del gen CAT a la intensidad de la interacción de las hélices transmembrana. Los plásmidos construidos que contienen los dominios transmembrana de Rot1 se utilizaron para transformar la cepa NT326 de *E. coli*, que es incapaz de crecer en medios con maltosa como única fuente de carbono, dado que tienen deletado el gen *MalE*. La correcta topología de las diferentes proteínas quiméricas en las membranas fue evaluada a través de la capacidad de las quimeras de recuperar la deficiencia de crecimiento de la cepa NT326 en medio mínimo suplementado con maltosa. Se usaron como control positivo de dimerización, células de *E. coli* transformadas con una construcción que lleva el fragmento transmembrana de la proteína glicoforina A (GpA) (Baño-Polo *et al.* 2012), una proteína empleada ampliamente en estudios de dimerización de hélices transmembrana, y como control negativo una construcción que expresa un mutante monomérico en el que se ha sustituido el residuo Gly83 por el aminoácido voluminoso isoleucina (GpA-G83I), que impide la dimerización de la región transmembrana de GpA. Al crecer estas células en placas con maltosa como única fuente de carbono, se observa que aquellas que expresan las construcciones con fragmentos transmembranas no presentan problemas de viabilidad celular, mientras que las células transformadas con una construcción que carece de este fragmento transmembrana (*pccKAN*) son inviables (Figura 6.1B), lo que demuestra la correcta orientación de las quimeras en la membrana interna de *E. coli*. Del mismo modo, la quimera que lleva el fragmento transmembrana de Rot1 (*pROT1-237-256*) presenta un crecimiento similar a los controles de GpA, lo cual está indicando que el dominio MBP de la quimera ha sido dirigido correctamente al periplasma de las células de *E. coli* y el fragmento transmembrana se ha insertado en la membrana interna también en esta construcción (Figura 6.1B).



**Figura 6.1. Dimerización del fragmento transmembrana de la proteína Rot1 en membranas de *E.coli*.** **A.** Representación esquemática del ensayo ToxCAT. Los dominios ToxR (cuadrados) activan la transcripción del gen reportero cuando estos dimerizan por efecto de la interacción de los dominios transmembrana. La proteína de unión a maltosa (elipses) demuestra la correcta orientación de las quimeras en la membrana. **B.** Ensayo de complementación de las diferentes construcciones. Células NT326, deficientes en el gen *malE*, transformadas con las construcciones a ensayar fueron inoculadas en una placa con maltosa como única fuente de carbono e incubadas durante tres días a 37°C. **C.** Ensayo de dimerización. La tasa de dimerización normalizada del dominio transmembrana de Rot1 se midió por medio de CAT-ELISA y se comparó con respecto al dominio transmembrana de la construcción GpA. En el panel inferior se muestran los niveles proteicos de las construcciones analizadas por *Western blot* y detectadas con el anticuerpo anti-MBP.

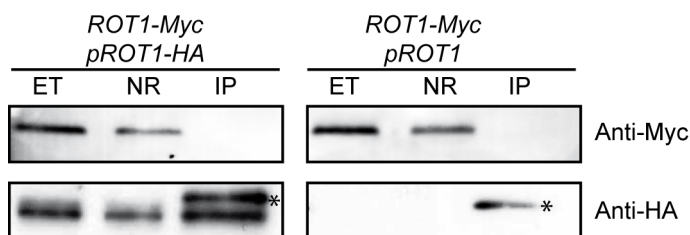
La tasa de dimerización del fragmento transmembrana de Rot1 se comparó frente a la construcción que lleva el fragmento transmembrana de GpA silvestre y frente a una que contiene un mutante puntual (GpA-G83I) que tiene disminuida su capacidad de dimerización. Tal y como se muestra en la Figura 6.1C, la construcción *pROT1-237-256* mostró tasas bajas de dimerización, similares al control negativo de la glicoforina (GpA G83I) y por lo tanto estos resultados indican que la interacción entre sí de los dominios transmembrana de la proteína Rot1 es muy poco probable.

En el panel inferior de la Figura 6.1C, se muestran los niveles de expresión de las construcciones a través de la visualización de la MBP mediante *Western blot*, donde se puede observar que la expresión es equivalente en todas las quimeras. Estos resultados sugieren que la proteína Rot1 no se encuentra formando homodímeros a través de la asociación de sus dominios transmembrana.

### **Estudio de la capacidad de homo-dimerización de la proteína Rot1 en levadura**

Dado que en el ensayo ToxCAT mostrado anteriormente solo se evaluó la capacidad de interacción del dominio transmembrana de Rot1, no se puede descartar que sea necesaria la presencia de otras regiones de la proteína para estabilizar o catalizar el proceso de autoasociación. Para completar el análisis de la posible dimerización de la proteína Rot1 se diseñó una estrategia de coimmunoprecipitación con la proteína completa y así poder determinar la posibilidad de formación de homo-oligómeros. Para esto se empleó una cepa de *S. cerevisiae* que expresa la proteína Rot1 marcada con dos etiquetas distintas. Células que expresan el gen *ROT1* endógeno etiquetado con el epítipo Myc en el extremo C-terminal, fueron transformadas con un vector que expresa la proteína Rot1 etiquetada con el epítipo HA en la región interna de la proteína (Figura 3.2). Como control se empleó un vector que expresa la proteína Rot1 sin etiqueta. La solubilización de las proteínas se hizo en presencia de Triton X-100. Al inmunoprecipitar la proteína Rot1 etiquetada con

HA con el anticuerpo específico, no se detectó en la fracción eluida la proteína marcada con Myc (Figura 6.2). Por tanto, el ensayo realizado en estas condiciones tampoco demostró la posible formación de homo-oligómeros de la proteína Rot1 completa, corroborando los resultados obtenidos en membranas procariotas con el ensayo ToxCAT. En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que tanto la presencia del detergente (Triton X-100) como las propias etiquetas de purificación utilizadas (Myc y HA) en este tipo de experimentos, pueden alterar posibles homo-interacciones de la proteína nativa *in vivo*.



**Figura 6.2. Coimmunoprecipitación de la proteína Rot1.** Extractos de las células de levadura con la proteína Rot1 etiquetada con el epítipo Myc y transformadas con un plásmido centromérico que expresan a Rot1 etiquetada con HA o sin etiqueta, fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA. La presencia de las formas de Rot1 etiquetadas con Myc en la fracción retenida en la resina anti-HA, fueron analizadas por *Western blot* y detectadas con un anticuerpo anti-Myc en el extracto total (ET), la fracción no retenida (NR) y en la fracción retenida (IP). \* Indica la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

### Análisis de la interacción de Rot1 con otras proteínas mediante ensayos de entrecruzamiento

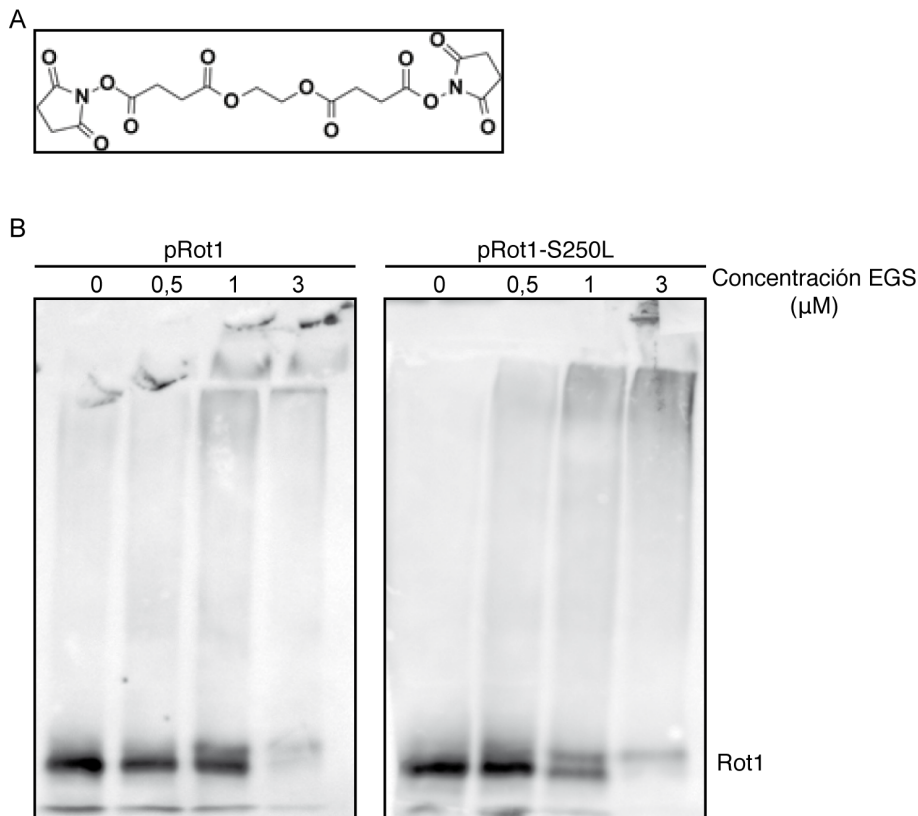
Una vez demostrado que la proteína Rot1 no homo-oligomerizaba, se enfocó el estudio a intentar identificar otras posibles interacciones con proteínas con las que puede estar asociada, formando complejos relacionados con su función en la supervivencia de la levadura *S. cerevisiae*. En una primera aproximación general para investigar la posible existencia de estos complejos



de los que Rot1 esté formando parte, se procedió a realizar una reacción de entrecruzamiento en extractos celulares de levadura transformadas con el vector que expresa la proteína etiquetada Rot1-HA para evitar que los protocolos de purificación utilizados perturben la estabilidad de posibles complejos funcionales. Al ser Rot1 una proteína integral de membrana se seleccionó un entrecruzador hidrofóbico, permeable a las membranas, que permitiera la posibilidad de entrecruzar proteínas asociadas a las membranas. Se utilizó el reactivo EGS (*Ethylene glycolbis (succinimidylsuccinate)*) (Figura 6.3A), un entrecruzador hidrofóbico con dos grupos funcionales NHS que reaccionan selectivamente con las aminas primarias de las proteínas a un pH 7-9. La reacción de entrecruzamiento se llevó a cabo en los extractos celulares previamente solubilizados con Triton X-100. En ausencia del entrecruzador EGS, el patrón de migración de la proteína Rot1 coincide con un marcador de peso molecular de 50 kDa aproximadamente correspondiente a la migración observada de la proteína, y a medida que se aumenta gradualmente la concentración del entrecruzador, los niveles de detección de Rot1 disminuyen (Figura 6.3B), lo que podría estar indicando la posible formación de complejos macromoleculares proteicos en los que Rot1 estaría implicada. No obstante, no se detectan bandas definidas que correspondan a cambios de movilidad concretos, es decir a la aparición de formas multiméricas que indiquen la asociación de Rot1 a otras proteínas. De hecho, a concentraciones elevadas del agente entrecruzador (3 $\mu$ M) la presencia de proteína en forma monomérica se ve reducida drásticamente. Esto podría deberse a que los complejos proteicos que se estén formando sean de alto peso molecular o agregados insolubles y no puedan resolverse mediante *SDS-PAGE* o que la etiqueta HA quede oculta al formarse estos complejos y por lo tanto no se pueda detectar.

Como se demostró anteriormente (Capítulo 3), el dominio transmembrana de Rot1, y más específicamente el residuo Ser250, es esencial

## Resultados



**Figura 6.3. Entrecruzamiento de la proteína Rot1.** **A.** Estructura química del EGS, entrecruzador hidrofóbico homobifuncional utilizado para entrecruzar a la proteína Rot1. **B.** Extractos celulares de levaduras transformadas con plásmidos que expresan las formas Rot1-HA y Rot1 S250L-HA fueron sometidos a una reacción de entrecruzamiento *in vivo* con el reactivo EGS en diferentes concentraciones. Los extractos fueron analizados mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-HA.

para la viabilidad celular, por lo que se decidió investigar si este residuo, que podría estar implicado en la interacción con otras proteínas, afectaba a la reacción de entrecruzamiento. Para ello, se realizó el mismo experimento con un extracto de levaduras transformadas con un vector que expresa la forma mutante de la proteína Rot1-HA-S250L bajo las mismas condiciones que en el

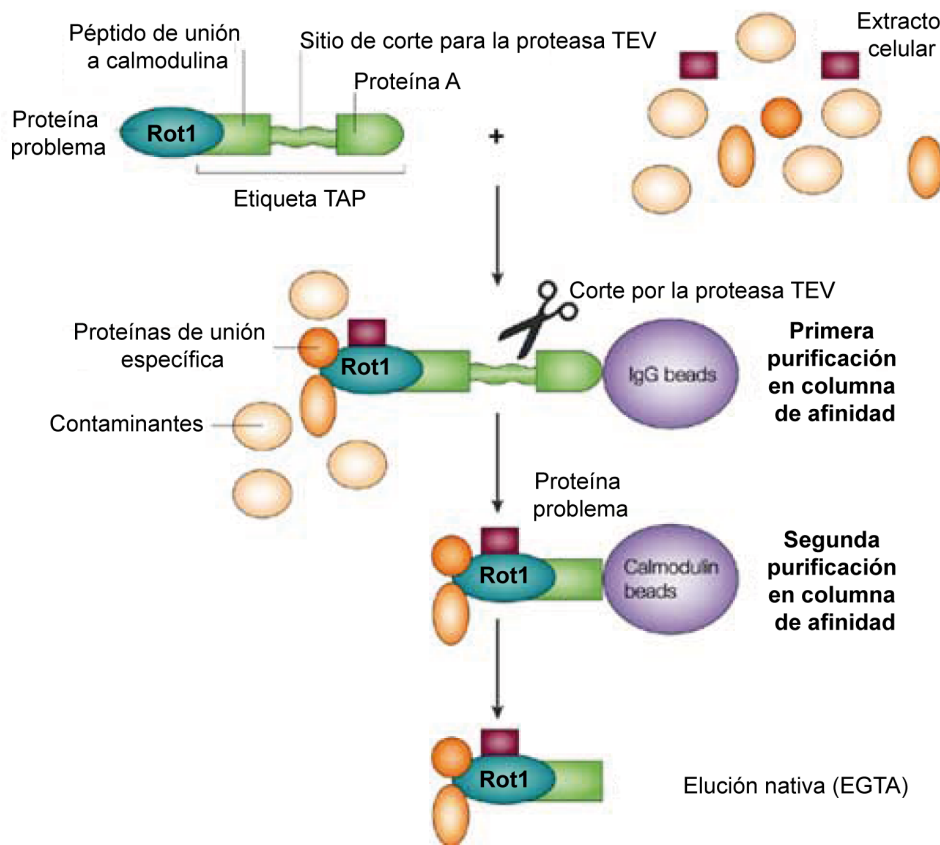
ensayo con la forma silvestre. Como se observa en el panel derecho de la Figura 6.3B, el comportamiento de la proteína mutante es similar al de la silvestre, sugiriendo que este residuo no parece afectar por si mismo a la capacidad de entrecruzamiento de las proteínas.

### **Análisis proteómico de las posibles interacciones de Rot1**

El resultado anterior sugiere que Rot1 interacciona con otras proteínas formando complejos o agregados de alto peso molecular, pudiendo ser estas interacciones necesarias para la función de Rot1 y para la viabilidad celular. Por lo tanto, se decidió realizar una búsqueda masiva de estas posibles proteínas, utilizando la purificación por afinidad en tándem TAP (*Tandem affinity purification*), una de las técnicas proteómicas que ha sido empleada para determinar una gran cantidad de interacciones entre proteínas solubles en *S. cerevisiae* (Krogan *et al.* 2006)

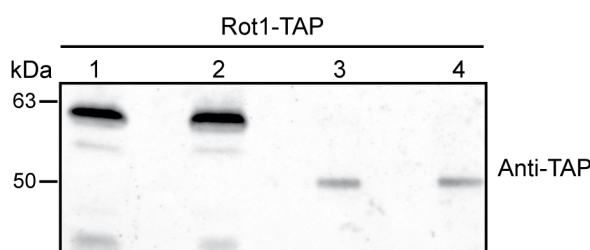
La etiqueta TAP esta formada por un dominio de unión a calmodulina, un sitio de corte para la proteasa TEV (una proteasa obtenida del virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*)) y los dominios de unión de la IgG de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (Figura 6.4). Los complejos proteicos que están etiquetados con TAP pueden purificarse en dos pasos muy específicos. En el primero, el complejo etiquetado con TAP se une a una columna con IgG. La elución se hace cortando el complejo proteico de la columna usando la enzima TEV. En el segundo paso de purificación, el complejo etiquetado con TAP se une a resinas de calmodulina. Después de eluir el complejo con EGTA, éste se puede analizar por espectrometría de masas y determinar los interactores de la proteína marcada con la etiqueta TAP (Xu *et al.* 2010). A pesar de la fiabilidad de la técnica, ésta presenta varios inconvenientes, especialmente que no puede ser fácilmente utilizada con proteínas de membrana porque el uso de los detergentes necesarios para solubilizar proteínas de membranas no son recomendables ya que pueden romper las interacciones entre proteínas. Sin embargo, recientemente, (Babu *et*

al. 2012) modificaron la técnica utilizando tres detergentes no iónicos diferentes que facilitan la extracción de las proteínas de membrana, Triton X-100, DDM (n-dodecil- $\beta$ -maltopiranosido) y C12E8 (octaetilene glicol monododecil éter).



**Figura 6.4. Diagrama esquemático del método de purificación por TAP.** En el primer paso, el complejo proteico junto con la proteína etiquetada, es purificado en una matriz de IgG por medio del dominio de la proteína A de la etiqueta TAP. El complejo proteico es eluido usando la proteasa TEV. A continuación, un segundo paso de purificación se lleva a cabo incubando la fracción proteica con perlas cubiertas con calmodulina en presencia de calcio. Finalmente el complejo es eluido empleando como quelante EGTA. (Adaptado de Huber 2003).

Para purificar la proteína Rot1 mediante este análisis se decidió usar el detergente Triton X-100 puesto que previamente había sido empleado en otros protocolos relacionados con la extracción de Rot1, como se detalla en Materiales y Métodos. Se utilizó una cepa de *S. cerevisiae* que expresa la proteína Rot1 marcada con la etiqueta TAP en el extremo C-terminal, a la cual se le realizó un seguimiento de la purificación en tándem. Como se observa en la Figura 6.5 la proteína Rot1 es extraída con el tampón de lisis escogido (carrera 1) y es purificada después de los dos pasos siguientes que se utilizan en la técnica TAP (carreras 3 y 4).



**Figura 6.5. Purificación de la proteína Rot1-TAP.** Extractos de células de levadura que expresan el gen Rot1 etiquetado con TAP en el dominio C-terminal fueron purificados con perlas de sefarosa y con perlas de calmodulina. Las fracciones correspondientes al extracto total (1), no retenida (2), a la obtenida después de la primera purificación y digestión con la proteasa TEV (3) y la final después de la segunda purificación (4) fueron analizadas por *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-TAP.

En el posterior análisis de espectrometría de masas de la fracción purificada de Rot1, se identificaron un total de 172 proteínas. Después de eliminar las proteínas que generalmente se encuentran como contaminantes en los experimentos de TAP, se obtuvieron 72 proteínas como posibles candidatos a formar interacciones con Rot1, las cuales se muestran en la Tabla 6.1. Esta extracción y análisis de los interactores de la proteína Rot1 etiquetada con TAP se realizó por duplicado, obteniéndose en ambos casos resultados similares tanto cuantitativa como cualitativamente. Como control de la especificidad de los resultados se empleó un extracto purificado por TAP de una cepa que llevaba el gen de la proteína Rot1 sin etiquetar.

**Tabla 6.1. Proteínas relevantes determinadas mediante espectrometría de masas en la purificación por TAP de la proteína Rot1**

Nombre	Descripción	Péptidos (95%)	%Cobertura (95%)
Def1	RNA polymerase II degradation factor 1	23	36,040
Spt5	Transcription elongation factor	10	13,550
Pdc1	Pyruvate decarboxylase isozyme 1	10	29,480
Stm1	Suppressor protein	6	35,900
eIF4A	ATP-dependent RNA helicase	6	22,030
GPP1	(DL)-glycerol-3-phosphatase 1	6	30,800
Kre6	Beta-glucan synthesis-associated protein	7	13,190
IF2B	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta	4	21,400
Eif31	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	4	17,000
Ef3a	Elongation factor 3A	5	5,651
RI402	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	3	26,560
RI401	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	3	26,560
Ub14p	Polyubiquitin	3	44,620
Imb4	Importin subunit beta-4	4	4,582
Tpis	Triosephosphate isomerase	4	27,020
Ubp3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3	3	5,482
If4f1	Eukaryotic initiation factor 4F subunit p150	3	3,676
Bre5	UBP3-associated protein	3	7,573

Tabla 6.1. Continuación

Nombre	Descripción	Péptidos (95%)	% Cobertura (95%)
Mpd2	Protein disulfide isomerase	3	16,970
Gcn1	Translational activator	3	1,310
Odpa	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	3	7,381
Bmh1	Protein BMH1	2	12,730
Bmh2	Protein BMH2	2	12,450
Act	Actin	4	9,867
Tsa1	Peroxi redoxin	3	22,450
Erf1	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	3	8,467
Eif3a	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	3	3,527
Cap	Adenylyl cyclase-associated protein	2	5,894
Sodc	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	3	20,130
Cap	Adenylyl cyclase-associated protein	2	5,894
Sodc	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	3	20,130
Eif3g	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	3	11,680
Cyph	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2	17,280
Odp2	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate	2	4,772
tctp	Translationally-controlled tumor protein homolog	2	16,170
Clc1	Clathrin light chain	2	11,160
Odpb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	2	6,284
Vatc	V-type proton ATPase subunit C	2	7,398

Tabla 6.1. Continuación

Nombre	Descripción	Péptidos (95%)	% Cobertura (95%)
AtpB	ATP synthase subunit beta	2	5,088
Kad1	Adenylate kinase 1	2	8,559
Lys12	Homoisocitrate dehydrogenase	1	2,695
Ssz1	Ribosome-associated complex subunit SSZ1	1	3,160
Zeo1	Protein ZEO1	1	11,500
Gsp1	GTP-binding nuclear protein GSP1/CNR1	1	5,023
Gsp2	GTP-binding nuclear protein GSP2/CNR2	1	5,000
Sec16	COPII coat assembly protein SEC16	2	1,276
Nug1	Nuclear GTP-binding protein NUG1	1	3,077
Mlc1	Myosin light chain 1	1	7,383
G6PI	Glucose-6-phosphate isomerase	1	2,888
Vps1	Vacuolar protein sorting-associated protein 1	1	1,847
Arb1	ABC transporter ATP-binding protein	1	2,131
Dhh1	ATP-dependent RNA helicase	1	2,174
Tba3	Tubulin alpha-3 chain	1	3,820
Rla1	60S acidic ribosomal protein P1-alpha	2	20,750
Nsa2	Ribosome biogenesis protein NSA2	1	7,663
Trx2	Thioredoxin-2	1	11,540
RI21A	60S ribosomal protein L21-A	6	41,870



Tabla 6.1. Continuación

Nombre	Descripción	Péptidos (95%)	% Cobertura (95%)
Trx1	Thioredoxin-1	1	11,650
Syec	Glutamate--tRNA ligase	1	2,260
K6pf2	6-phosphofructokinase subunit beta	1	1,251
H3	Histone H3	1	5,147
Kre9	Cell wall synthesis protein	1	3,986
Dbp5	ATP-dependent RNA helicase	1	2,697
H2B2	Histone H2B.2	1	6,870
H2B1	Histone H2B.1	1	6,870
H2az	Histone H2A.Z	1	6,716
Vatd	V-type proton ATPase subunit D	1	4,297
Cdc48	Cell division control protein 48	3	4,551
Kar2	78 kDa glucose-regulated protein homolog	3	5,132
Lsg1	Large subunit GTPase 1	1	1,406
Rl39	60S ribosomal protein L39	1	19,610
Erf3	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit	2	4,964
IF2P	Eukaryotic translation initiation factor 5B	2	2,295
Rs29B	40S ribosomal protein S29-B	1	17,860
Rot1	r-protein KU 11	1	6,641

## Resultados

---

De los resultados mostrados en la Tabla 6.1 es interesante mencionar que generalmente en los estudios de TAP, el análisis de espectrometría de masas muestra en mayor proporción la proteína de interés (cebo) etiquetada con TAP, puesto que ésta se encuentra enriquecida en el extracto final. En el presente caso, el análisis proteómico de la purificación de la proteína Rot1-TAP detectó un solo péptido de la proteína cebo apareciendo en último lugar en el listado de las proteínas identificadas. Cuando se somete la secuencia de Rot1 a un análisis computacional para predecir los péptidos generados en una digestión con tripsina *in silico* (*PeptideMass*, disponible en [http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/)), se obtienen una serie de péptidos que se muestran en la Tabla 6.2. De estos péptidos, solamente se han observado en experimentos de espectroscopía de masas, los destacados en rojo.

**Tabla 6.2 Péptidos producto de la digestión por tripsina de la proteína Rot1 predichos por el programa *PeptideMass***

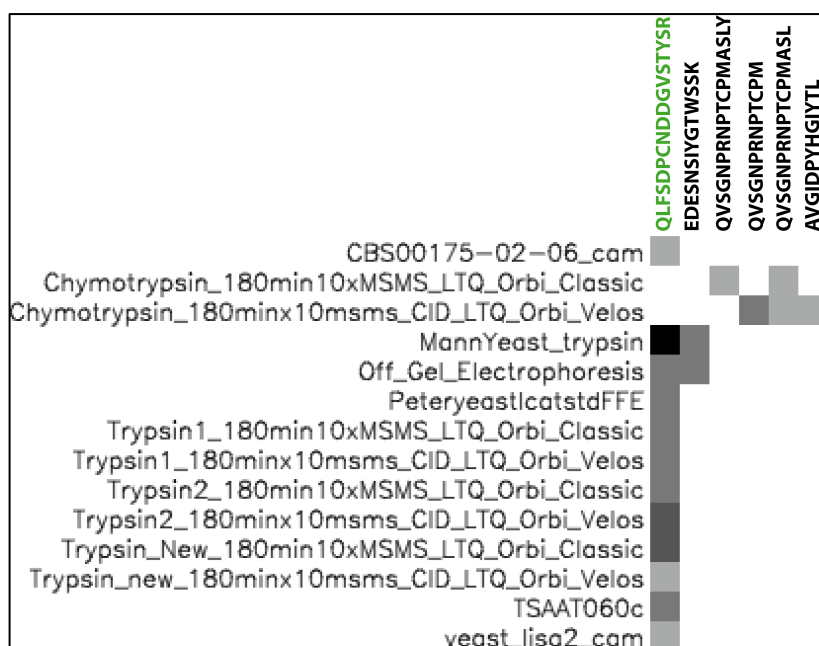
Posición	Péptido
146-204	EY <b>AVGIDPYHGIYTL</b> QLYQYDGTMPQPLYLAYRPPMMLPTETLNPTSSATSTDDPSSNK
39-86	SNQVFTGPGFYDPVDELLIEPSLPGLSYSFTEDGWYEEATY <b>QVSGNPR</b>
87-120	<b>NPTCPMASLIY</b> QHGTYNISENGTLVLNPIEVDGR
228-256	QNTSFLTSNAIWYISAGMLGVGSLLFLAF
22-38	VY <b>EDESNSIYGTWSSK</b>
121-137	<b>QLFSDPCNDDGVSTYSR</b>
11-21	LILGGYLFAQK
138-145	YNQTETFK
214-219	SLENR
1-4	MWSK
222-226	TNAIK
6-9	FTLK

Así, cuando se hace una búsqueda de los péptidos determinados para Rot1 en experimentos proteómicos en la base de datos *Peptide Atlas* ([www.peptideatlas.org](http://www.peptideatlas.org), un proyecto que se encarga de anotar todas las proteínas expresadas de los organismos eucariotas a través del almacenamiento de péptidos identificados en los diferentes estudios proteómicos publicados) se obtiene que, a pesar de haberse identificado seis péptidos para la proteína Rot1, el que se detectó en el presente trabajo (121-137) es el que aparece con un mayor número de observaciones experimentales y es el más probable en ser determinado (Tabla 6.3). De hecho es el único que se predice como péptido definido tras las digestiones con tripsina (Tabla 6.2). Además, es importante resaltar que los otros péptidos son detectados cuando en el ensayo las proteínas son sometidas a digestión con quimiotripsina (Figura 6.6) en lugar de tripsina, que es la proteasa más comúnmente utilizada en este tipo de experimentos proteómicos y que se usó en el presente estudio.

**Tabla 6.3. Péptidos observados y anotados para la proteína Rot1 en la base de datos *Peptide Atlas***

Secuencia	No total de observaciones	No de muestras	EOS	ESS
QLFSDPCNDDGVSTYSR	28	12	0,86	1,00
EDESNSIYGTWSSK	4	2	0,14	0,09
AVGIDPYHGIYTL	1	1	0,07	0,07
QVSGNPRNPTCPMAS	2	2	0,14	0,06
QVSGNPRNPTCPM	2	1	0,07	0,05
QVSGNPRNPTCPMASLIY	1	1	0,07	0,05

**EOS: *Empirical Observability Score***, una medida de cuantas muestras de un péptido en particular es observado con respecto a otros péptidos de la misma proteína. **ESS: *Empirical Suitability Score***, valor derivado de la probabilidad del péptido, el EOS y el número de veces observado



**Figura 6.6. Detección de péptidos de Rot 1 en diferentes experimentos proteómicos.** Se muestran los diferentes ensayos y aproximaciones experimentales donde se observan los péptidos de Rot1 anotados en la base de datos *Peptide Atlas* ([db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/GetProtein?atlas\\_build\\_id=377&protein\\_name=YMR200W&action=QUERY](http://db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/GetProtein?atlas_build_id=377&protein_name=YMR200W&action=QUERY))

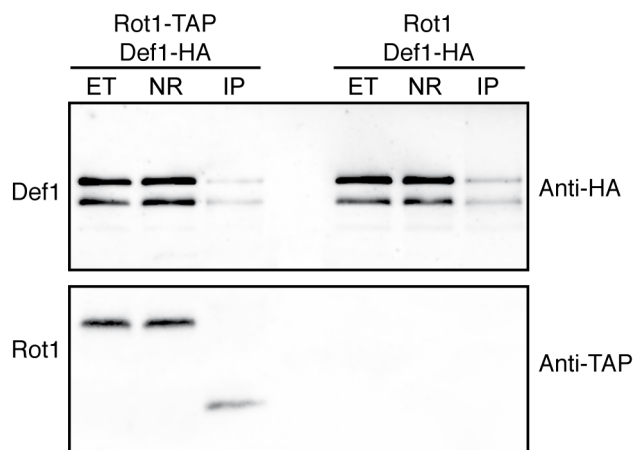
#### *Estudio de la interacción de la proteína Rot1 con Def1*

Dentro de las proteínas identificadas en el análisis de purificación por TAP de Rot1, cabe destacar que la proteína Def1 aparece en primer lugar del listado, lo que la sitúa como la candidata con mayor probabilidad de estar interaccionando con Rot1, ya que fue la proteína identificada en mayor proporción en la fracción purificada (23 péptidos que cubren un total del 36% de la proteína; Tabla 6.1). La proteína Def1 es una proteína de alrededor de 84 kDa, localizada en el núcleo, donde actúa como factor de degradación de la RNA Polimerasa II a través de la ubiquitinación y

proteólisis de la polimerasa. Esta posible interacción es interesante ya que aparentemente no comparte ni función celular ni localización subcelular con la proteína Rot1. Para dilucidar si esta asociación era directa y significativa se decidió comprobarla mediante una serie de ensayos de coimmunoprecipitación, que se detallan a continuación.

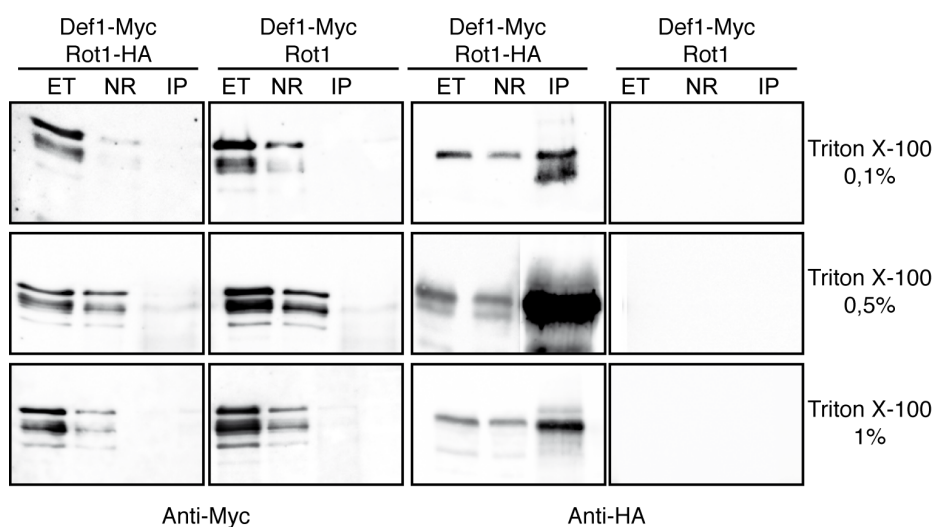
Como primera aproximación, se empleó una cepa de *S. cerevisiae* que expresa la proteína Def1 etiquetada con el epítipo HA en su extremo C-terminal y la proteína Rot1 marcada con la etiqueta TAP (Figura 6.4). Se inmunoprecipitó la proteína Rot1 siguiendo dos pasos de purificación de manera similar al protocolo de TAP pero a una escala menor, utilizando Triton X-100 al 1% para mantener en la medida de lo posible las condiciones nativas. Al analizar los resultados por *western blot* en la fracción purificada se detectó la proteína Def1 tanto en la cepa Rot1-TAP como en la cepa control de Rot1 sin etiquetar (Figura 6.7). Esto indica que la interacción aquí observada es inespecífica y por lo tanto no concluyente.

En otro intento de comprobar la interacción encontrada en la purificación por TAP, y dados los resultados inespecíficos mostrados anteriormente se decidió realizar la coimmunoprecipitación utilizando otras estrategias. Para ello se construyó una cepa de *S. cerevisiae* donde la proteína Def1 nativa se etiquetó con el epítipo Myc y se transformó con un vector que expresa a la proteína Rot1 etiquetada ó no con el epítipo HA. Para inmunoprecipitar la proteína Rot1 se emplearon perlas magnéticas *Dynabeads*® conjugadas con un anticuerpo anti-HA en extractos celulares obtenidos con diferentes concentraciones del detergente Triton X-100. En la Figura 6.8 se muestran los resultados de estos ensayos.



**Figura 6.7. Interacción de la proteína Rot1 con Def1.** Extractos de células de levadura que expresan el gen *DEF1* etiquetado con el epítipo HA y el gen *ROT1* etiquetado con TAP o el gen sin la etiqueta fueron inmunoprecipitados y copurificados. La presencia de las formas de Def1 etiquetadas con HA fueron analizadas por *Western blot* y detectadas con un anticuerpo anti-HA en el extracto total (ET), la fracción no retenida (NR) y en la fracción retenida (IP).

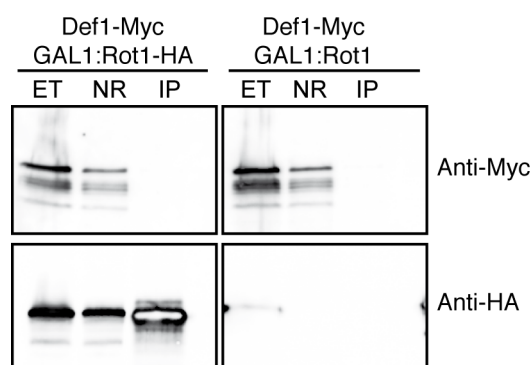
Los resultados obtenidos fueron similares a los mostrados anteriormente con la estrategia de la etiqueta TAP. Se utilizaron varias concentraciones de Triton X-100 (0.1, 0.5 y 1%) para facilitar la extracción de la proteína Rot1 (Figura 6.8). Sin embargo, en ninguna de las inmunoprecipitaciones de los diferentes extractos se pudo co-purificar a la proteína Def1 de forma clara ya que no se detectaron bandas al incubar las fracciones eluidas con un anticuerpo anti-Myc, por lo que no se pudo confirmar la existencia de una interacción directa entre las proteínas Def1 y Rot1. Es interesante destacar que aquí no se detectaron interacciones inespecíficas en ninguno de los controles (proteína Rot1 sin etiquetar) a diferencia de lo que ocurre en el caso de la inmunoprecipitación con TAP (Figura 6.7).



**Figura 6.8. Interacción de la proteína Rot1 con Def1.** Extractos de células de levadura que expresan el gen *DEF1* etiquetado con el epítipo Myc que fueron transformadas con vectores que llevan el gen *ROT1* etiquetado con HA, o el gen sin etiqueta fueron preparados utilizando diferentes concentraciones de Triton X-100 e inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA. La presencia de las formas de Def1 etiquetadas con Myc fueron analizadas por *Western blot* y detectadas con un anticuerpo anti-Myc en el extracto total (ET), la fracción no retenida (NR) y en la fracción retenida (IP).

Una de las posibles causas de no poder detectar la interacción con Def1 podría ser la poca abundancia de Rot1 en las células de levadura, ya que es una proteína con un bajo número de copias. Para evaluar esta posibilidad se transformó la cepa *DEF1-HA* con un vector que expresa el gen *ROT1* bajo el control del promotor *GAL1* y así sobre expresar la proteína en presencia de galactosa y obtener un mayor número de moléculas y favorecer la interacción entre las proteínas estudiadas. Sin embargo al inmunoprecipitar a la proteína Rot1 sobreexpresada, como se puede comprobar por los altos niveles detectados en el *Western blot* incubado con anti-HA, tampoco se detectó la proteína Def1-Myc (Figura 6.9).

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos en los diferentes intentos de co-inmunoprecipitar Rot1 y Def1, se puede concluir que la interacción encontrada entre estas dos proteínas mediante aproximaciones proteómicas al purificarlas por la técnica TAP no puede ser reproducida en las condiciones mostradas y no se puede afirmar que estas dos proteínas interactúen físicamente en las células de *S. cerevisiae*.



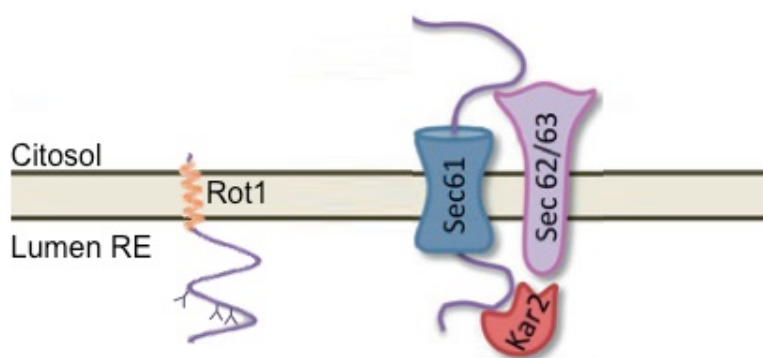
**Figura 6.9. Interacción de la proteína Rot1 con Def1.** Extractos de células de levadura que expresan el gen *DEF1* etiquetado con el epítipo Myc que fueron transformadas con vectores que llevan el gen *ROT1* bajo el promotor *GAL1* y etiquetado con HA, o el gen sin etiqueta sobreexpresadas en presencia de galactosa e inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA. La presencia de las formas de Def1 etiquetadas con Myc fueron analizadas por *Western blot* y detectadas con un anticuerpo anti-Myc en el extracto total (ET), la fracción no retenida (NR) y en la fracción retenida (IP).

#### *Estudio de la interacción de Rot1 con la chaperona Kar2*

Una vez visto que no se pudo comprobar directamente la interacción de Rot1 con la proteína Def1, surgió la pregunta sobre si alguna de las proteínas encontradas en la purificación en tándem era significativa. Para ello se decidió analizar de acuerdo con los resultados del TAP, la única



proteína descrita en la literatura que interacciona físicamente con Rot1, la chaperona Kar2. Esta proteína es la homóloga de la proteína de mamíferos Bip1 en levaduras, con un peso molecular de 74 kDa y que se encuentra asociada a la membrana del retículo endoplásmico en el lado luminal. Es una ATPasa que promueve la importación de proteínas al retículo endoplásmico y el plegamiento de polipéptidos recién sintetizados (Figura 6.10) (Fewell *et al.* 2001). En un trabajo previo se describió la asociación de Rot1 con Kar2 mediante coimmunoprecipitación, por lo que esta proteína podría utilizarse como indicador positivo de las interacciones de Rot1 (Takeuchi *et al.* 2008).



**Figura 6.10. Esquema de la ubicación de las proteínas Sec62/63 y Kar2 en la membrana del retículo endoplásmico.** En este esquema se muestran las interacciones existentes entre el complejo Sec62/63 y la chaperona Kar2, las cuales participan en la translocación de proteínas a través del translocón Sec61 por medio del mecanismo post-traducciona. También se muestra la ubicación en la membrana de la proteína Rot1. (Adaptado de Ast & Schuldiner 2013)

Se decidió comprobar esta interacción mediante técnicas de coimmunoprecipitación, transformando una cepa de *S. cerevisiae* que expresa la proteína Kar2 etiquetada con el epítipo FLAG, con un vector que lleva la proteína Rot1 etiquetada con HA. Como control se utilizó un vector

que lleva el gen de la proteína Rot1 sin etiquetar. En el extracto proteico se inmunoprecipitó la proteína Rot1 con un anticuerpo que reconoce la etiqueta HA. En la fracción purificada de Rot1 se pudo detectar la banda correspondiente a la chaperona Kar2 (Figura 6.11), confirmando la interacción directa de estas dos proteínas. No obstante, como puede observarse en el panel derecho de la Figura 6.11, se detecta una ligera banda correspondiente a Kar2 en los extractos de células transformadas con Rot1 sin etiquetar. Para poder eliminar el ruido de fondo se cuantificaron las bandas, mostrándose los valores de densidad relativos en el panel inferior de la Figura 6.11.

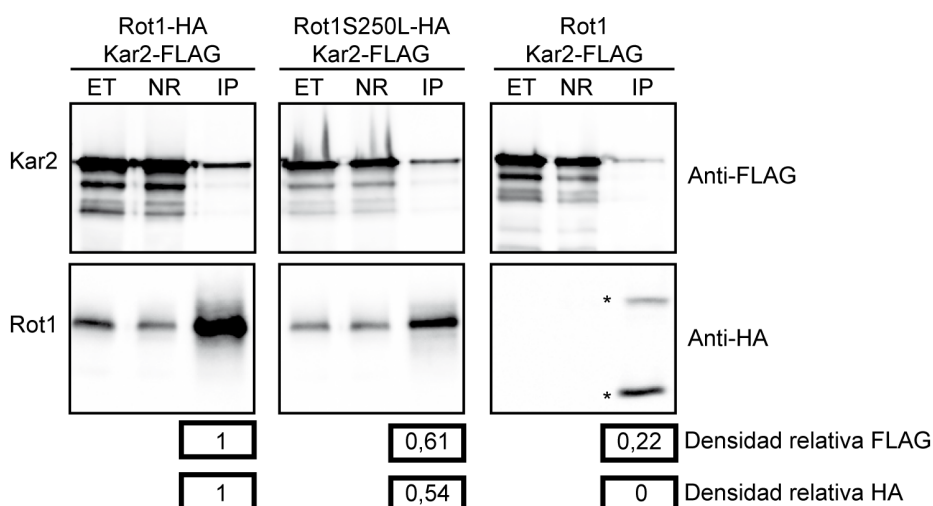
También se estudió el papel del residuo Ser250 del fragmento transmembrana en la interacción Rot1-Kar2. Para ello se inmunoprecipitó la forma mutante Rot1-S250L-HA en un extracto que también llevaba la proteína Kar2 marcada con el epítipo FLAG, de manera similar a lo mencionado anteriormente. Al analizar la fracción inmunoprecipitada se detecta igualmente a la proteína Kar2 (Figura 6.11) lo cual permite concluir que la mutación de la Ser250 a leucina no está afectando de forma significativa la unión de Rot1 con la chaperona y por lo tanto este residuo no parece ser determinante para la interacción Rot1-Kar2.

#### *Interacción de la proteína Rot1 con la proteína del complejo de secreción Sec62*

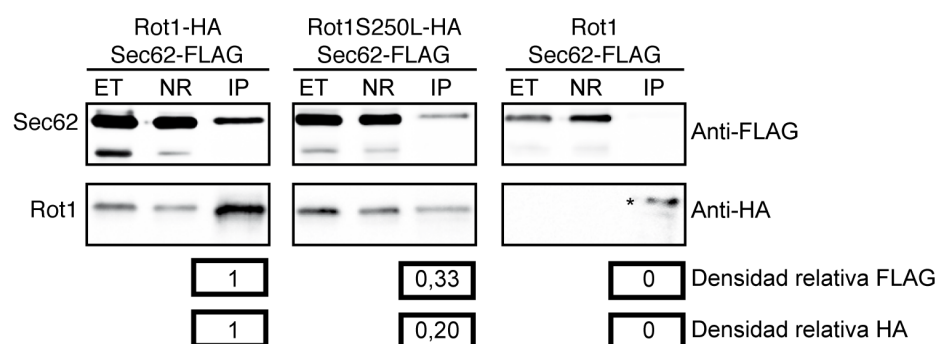
Sec62 es una proteína de 30 kDa, integral de membrana con dos dominios transmembrana, con sus dos extremos N- y C- terminal orientados hacia el citosol. Es una subunidad esencial del translocón y forma, junto con otras proteínas, un canal competente para la translocación postraduccional al retículo endoplásmico de diferentes proteínas (Figuras 1.6 y 6.10). Sec62 es una proteína candidata a interactuar con Rot1 puesto que previamente en nuestro laboratorio se había descrito que Rot1 se transloca al retículo endoplasmático a través de un mecanismo post-traduccional dependiente

de Sec62 (Juanes *et al.* 2008). Sin embargo, no se detectó en el análisis por espectrometría de masas del TAP de Rot1.

Dado que la interacción directa nunca ha sido demostrada, se decidió realizar un ensayo de coimmunoprecipitación etiquetando a la proteína Sec62 con el epítipo FLAG en su extremo C-terminal, para intentar demostrar la existencia de una interacción física entre ambas proteínas. La Figura 6.12 muestra de manera clara que Sec62 coimmunoprecipita con Rot1, demostrando así la interacción de Rot1 con la proteína del translocón Sec62.



**Figura 6.11. Interacción de la proteína Rot1 con Kar2.** Extractos de células de levadura que expresan el gen *KAR2* etiquetado con el epítipo FLAG en el extremo C-terminal, que fueron transformadas con vectores que llevan el gen *ROT1* y el gen mutante *ROT1-S250L* etiquetados con HA o el gen sin etiqueta, fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA. La presencia de las formas de Kar2 etiquetadas con FLAG fueron analizadas por *Western blot* y detectadas con un anticuerpo anti-FLAG en el extracto total (ET), la fracción no retenida (NR) y en la fracción retenida (IP). \* indican la cadena pesada y ligera de las inmunoglobulinas. En la parte inferior se muestran las densidades relativas de las bandas obtenidas con cada anticuerpo, con respecto al experimento realizado inmunoprecipitando a Rot1 silvestre etiquetado.



**Figura 6.12. Interacción de la proteína Rot1 con Sec62.** Extractos de células de levadura que expresan el gen *SEC2* etiquetado con el epítipo FLAG que fueron transformadas con vectores que llevan el gen *ROT1* y el gen mutante *ROT1-S250L* etiquetados con HA o el gen sin etiqueta, fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA. La presencia de las formas de Sec62 etiquetadas con FLAG fueron analizadas por *Western blot* y detectadas con un anticuerpo anti-FLAG en el extracto total (ET), la fracción no retenida (NR) y en la fracción retenida (IP). \* indica la cadena pesada de las inmunoglobulinas. En la parte inferior se muestran las densidades relativas de las bandas obtenidas con cada anticuerpo, con respecto al experimento realizado inmunoprecipitando a Rot1 silvestre etiquetado.

De nuevo, el mismo experimento se realizó transformando la cepa con el plásmido que lleva la forma mutante S250L de Rot1. Como puede observarse en la Figura 6.12, también se detectó la unión de la proteína mutante con Sec62, por lo que se concluye que la importancia de este residuo para la viabilidad celular no parece estar relacionada con la translocación de la proteína al retículo endoplasmático, dado que la interacción del mutante S250L con Sec62 no parece verse afectada de forma significativa. Cabe mencionar que este resultado se ve corroborado por los mostrados en la Figura 3.8, donde se observó que el estatus de glicosilación de la forma mutante no se encontraba afectado y por lo tanto el mutante Rot1-S250L debe translocarse correctamente al lumen del retículo endoplásmico donde reside la actividad de la enzima glicosil transferasa, independientemente de la presencia de la mencionada mutación en el segmento transmembrana.

## 7. Discusión

---

Desde el punto de vista bioquímico la proteína de membrana Rot1 presenta una serie de peculiaridades que la hacen especialmente interesante. Rot1 es una proteína esencial y cualquier delección es letal para la célula; es una proteína que se glicosila en el retículo endoplásmico, pero a diferencia de la mayoría de proteínas descritas que sufren esta modificación, Rot1 lo hace por un mecanismo postraduccional independiente de la SRP y dependiente del complejo Sec62/63. Además, su topología no acaba de encajar completamente a las descritas anteriormente (ver Introducción, pg 18) puesto que se ancla a la membrana a través de un dominio C-terminal, pero su extremo N-terminal se encuentra orientado hacia el lumen del retículo endoplásmico en lugar de al citoplasma, como lo hacen proteínas con un anclaje en C-terminal (*C-terminal anchored proteins*). Entre las posibles funciones que se le atribuyen a la proteína destacar que son muy diversas y parece ser que directa o indirectamente, están relacionadas con diferentes procesos celulares. Merece ser resaltada la función descrita por nuestro grupo en el control de la degradación de la

ciclina Clb2 (Juanes *et al.* 2007), molécula que aparentemente no comparte ubicación subcelular ni relación funcional con Rot1.

Por todo esto, en este trabajo se decidió realizar una caracterización amplia de la proteína Rot1 analizando con detalle su dominio transmembrana, identificando los mecanismos que se encargan de su translocación e inserción al retículo endoplásmico, su proceso de degradación y las diferentes proteínas con las que pueda estar interaccionando y/o formando complejos que le permitan llevar a cabo su función.

### **El residuo Ser250 del dominio transmembrana de Rot1 es esencial para la viabilidad celular**

El campo de estudio de las proteínas de membrana ha realizado notables avances en cuanto a la determinación de sus mecanismos de inserción en las membranas biológicas, los complejos proteicos que acompañan dichos procesos, los dominios y secuencias que marcan su topogénesis, etc. Sin embargo, aun existen numerosos interrogantes, por lo que este trabajo se ha centrado en una de estas proteínas de membrana, Rot1, cuyas características la hacen interesante para aportar más información a este importante grupo de proteínas.

Rot1 es una proteína particular, ya que su segmento transmembrana no solamente actúa como un elemento de anclaje a la membrana sino que también juega un papel relevante en la viabilidad de la célula. Previamente, en nuestro grupo se había observado que al sustituir el fragmento transmembrana de la proteína por un segmento de polileucinas (residuo que tiene una elevada tendencia natural a formar hélices  $\alpha$  y que es el más abundante en los segmentos transmembrana), Rot1 no perdía su capacidad de asociarse a la membrana del retículo endoplásmico pero sí provocaba la inviabilidad celular (Juanes *et al.* 2008). Por lo tanto consideramos que el dominio C-terminal de Rot1 podría postularse como un modelo interesante para determinar la importancia de dominios hidrofóbicos

de las proteínas de membrana, con la ventaja de emplear una proteína esencial, que permite estudiar la relevancia de los residuos de manera individual en la función proteica a través de pruebas de viabilidad celular en un sistema *in vivo*.

Así, se evaluó la participación de cada uno de los residuos del dominio transmembrana en la función de Rot1. Después del rastreo realizado utilizando como estrategias las inserciones de alanina y las sustituciones por leucina, se identificó únicamente el residuo de serina ubicado en la posición 250 como un aminoácido esencial dentro del dominio transmembrana, para la función de la proteína:

<sup>238</sup>**AIWYSAGMLGVGS<sup>250</sup>LLFLAF<sup>256</sup>**

Además, se comprobó que la única forma de recuperar el fenotipo de viabilidad celular ocurre al reemplazar la serina por un residuo de treonina. Ninguno de los otros residuos mencionados por los que se sustituyó el residuo Ser250 fueron capaces de permitir la recuperación de la función proteica, lo cual demostró que la presencia de un grupo –OH es esencial para la función que ejerce Rot1 en la célula, probablemente a través de la formación de puentes de hidrógeno con otros componentes de la membrana.

Estos resultados son compatibles con la información encontrada en cuanto a la distribución de los aminoácidos hidrofílicos en las proteínas de membrana. En general, las hélices transmembrana contienen pocos residuos polares puesto que la inserción de estos en la membrana es energéticamente poco favorable, aunque entre ellos son la serina y la treonina los más abundantes, con porcentajes de abundancia superiores al 5%, mientras que el resto de residuos polares presentan valores inferiores al 2% (Baeza-Delgado *et al.*, 2013). La presencia de residuos hidrofílicos dentro de las hélices transmembrana se encuentra ampliamente justificada y descrita, al cumplir un importante papel estructural y funcional (Chin &

Heijne 2000; Zhou *et al.* 2000; Junne *et al.* 2007; Krishnakumar & London 2007).

La necesidad de la presencia en la posición 250 de una serina o en su defecto de una treonina, demuestra que el grupo hidroxilo que caracteriza la cadena lateral de estos aminoácidos es esencial para tener una proteína funcional. Es imprescindible resaltar que la serina (y la treonina) es un residuo polar sin carga, por lo que representa cierto impedimento para la inserción del dominio transmembrana en la bicapa.

En este punto surge la cuestión de la necesidad de este residuo de serina (o del grupo hidroxilo) dentro del dominio transmembrana de Rot1. Se ha postulado que la integración de los segmentos transmembrana en las membranas incluye una etapa en la cual las hélices  $\alpha$  preformadas se insertan en la bicapa (Mingarro *et al.* 2000; Woolhead *et al.* 2004), para que posteriormente, las hélices sufran interacciones intra- e inter helicoidales, formando estructuras más complejas que conducen a la formación de estructuras estables funcional y estructuralmente (Popot & Engelman 2000; Engelman *et al.* 2003). Previamente se había investigado la capacidad de diferentes residuos con cadenas laterales polares en la formación de asociaciones entre hélices transmembrana en micelas de detergente y en membranas biológicas, insertando los residuos en una posición central dentro de un segmento de 20 residuos de leucinas, que estaba fusionado al extremo C-terminal de la nucleasa de *Staphylococcus* (Zhou *et al.* 2001). En este diseño, la presencia de una única serina o treonina no fue capaz de promover la formación de oligómeros, indicando que el grupo hidroxilo de la serina tiene un papel relativamente modesto en la estabilización de la asociación de péptidos, con respecto a otros residuos polares como la asparagina o la glutamina. Podría pensarse entonces que el papel principal de este residuo (al igual que el de la treonina) es el de la formación de puentes de hidrógeno intrahelicoidales, con los grupos polares del esqueleto polipeptídico de la hélice. De esta manera, estos residuos podrían estar contribuyendo a la estabilización de la propia proteína, si bien no se puede



descartar su interacción con otros componentes de la membrana de la levadura.

Es importante destacar que cuando se reemplazó el residuo de Ser250 por tirosina (con un grupo funcional hidroxilo aunque con una cadena lateral mas voluminosa que la serina o la treonina) y cisteína (residuo con un grupo polar sulfhidrilo que también puede participar en la formación de puentes de hidrógeno), la proteína mutante no fue capaz de recuperar la viabilidad de la célula. Además, cuando se posicionó el residuo de serina un residuo o un giro de hélice en N- o C- terminal respecto de su posición original, las células seguían siendo inviables. Estos resultados indican la necesidad del grupo hidroxilo, ubicado sobre un residuo poco voluminoso y en una localización específica, en donde el puente de hidrógeno debe formarse cerca al extremo C-terminal de la hélice transmembrana en una posición y orientación concreta.

Se ha descrito que una simple interacción serina-serina no es capaz de permitir la asociación de segmentos transmembranas (Dawson *et al.* 2002). No obstante, sí se ha postulado la existencia de interacciones entre múltiples residuos de serina, formando motivos de serina ("*serine zipper*") aunque cabe aclarar que estos siempre se han analizado a través de estudios *in silico* o de péptidos diseñados y evaluados *in vitro*, como en el caso de los determinados para los fragmentos transmembrana de la citocromo oxidasa de diferentes especies (Adamian & Liang 2002; North *et al.* 2006). En la secuencia del fragmento transmembrana de Rot1 solo existe otra serina en la posición Ser242. Sin embargo, la sustitución de esta por leucina no afectó la viabilidad celular, por lo que se podría descartar la participación de un motivo de serinas en la estabilización de interacciones entre distintas hélices.

Para diseccionar con detalle el efecto de la sustitución S250L en la localización subcelular de la proteína, se evaluó la capacidad del mutante de integrarse en la membrana del retículo endoplasmático, mediante fraccionamiento subcelular y localización por inmunofluorescencia *in situ*,

sin llegar a observar algún efecto deletéreo, por lo que se concluyó que la ausencia de la serina y su grupo funcional no es importante para la correcta localización de la proteína.

¿Cuál puede ser el papel esencial de un grupo hidroxilo –OH en un segmento transmembrana?. Se han descrito algunos casos en donde residuos de serina ubicados en segmentos transmembrana tienen algún tipo de impacto en el funcionamiento de la proteína. En la proteína MRP3 (*multidrug-resistance-protein 3*), relacionada con la resistencia a los medicamentos contra el cáncer, al sustituir las serinas localizadas en el segmento transmembrana 17 se ve afectada la capacidad de unión a diferentes sustratos, así como el transporte de ciertos compuestos, aunque cada una contribuye de forma diferente a la especificidad global por los sustratos evaluados (Zhang *et al.* 2003).

En otro caso similar, se demostró que el residuo Ser85, ubicado en la segunda hélice transmembrana de la rodopsina, una proteína ubicada en los bastones y que es responsable de la visión en condiciones de penumbra, tiene un papel significativo en el mantenimiento de las propiedades estéricas y electrostáticas de la molécula. En el estudio se postula la formación de un puente de hidrógeno con otros residuos importantes (Dukkipati *et al.* 2001). En el receptor adrenérgico  $\beta_2$ , la sustitución del residuo Ser319 del TM7 afecta la expresión y la función de la proteína. Además, si se sustituyen los residuos Ser162 y Ser165 del TM4, la expresión y la actividad del receptor decrece, aunque la capacidad de unión específica al sustrato no se ve afectada (Chelikani *et al.* 2007; Arakawa *et al.* 2011).

En el presente trabajo no se ha podido llegar a determinar el proceso exacto en el que el residuo Ser250 está involucrado, debido también a que la función de Rot1 aún no ha sido aclarada, pero sí que se ha podido describir por primera vez la importancia de un solo residuo de serina dentro de un segmento transmembrana en la viabilidad celular en *S. cerevisiae*. Además, como se desprende del análisis bioinformático

mostrado (ver Capítulo 3), la serina es un residuo altamente conservado en las diferentes especies de hongos unicelulares evaluados (se encontró en 21 de las 25 secuencias transmembrana analizadas). En cualquier caso, cuando se descubran los mecanismos en los que esta implicada la proteína Rot1, se podrá evaluar directamente el papel del aminoácido Ser250 y observar como interactúa, probablemente a través de su grupo hidroxilo, con los sustratos o proteínas encontrados.

### **Señalización de la proteína Rot1 al retículo endoplásmico**

Estudios previos han descrito que la proteína Rot1 no necesita de una secuencia señal en el extremo N-terminal para su correcta localización, aunque sí para su función (Juanes *et al.* 2008). La pregunta directa que surge de este resultado es: ¿cuál es entonces, la secuencia señal que reconoce el sistema postraducciona de transporte al retículo endoplásmico de proteínas en las células de levadura? Para contestar esto, se generaron una serie de mutantes de delección de los extremos N- y C- terminal y se analizó su estatus de glicosilación a través de la digestión con endoglicosidasa H y su localización celular por medio de inmunofluorescencia indirecta.

Después de analizarlas se encontró que dos formas truncadas pequeñas, Rot1-26-149 y Rot1-91-228, aún son capaces de dirigirse al retículo endoplásmico, aunque no de manera tan eficiente como la proteína completa. De estos resultados se puede concluir que dichas regiones contienen información topológica que es reconocida por el mecanismo encargado de dirigir a la proteína Rot1 a la membrana reticular. Sin embargo, un análisis más profundo de estos resultados muestra que el escenario propuesto para la proteína no es sencillo.

Si la forma mutante Rot1-91-228 se deleciona aun más por el extremo C-terminal, eliminando la región 200-228, la forma mutante obtenida Rot1-91-200 se deslocaliza completamente y su capacidad de dirigirse al retículo endoplásmico es anulada. Un comportamiento similar al

del fragmento Rot1-91-228, se observó con la forma mutante Rot1-61-228. ¿Qué quiere decir esto? Aparentemente, la respuesta es clara: la secuencia implicada en el transporte de la proteína al retículo endoplásmico sería la de los residuos 200-228. No obstante, otros resultados indican que este dominio por sí mismo no puede ser el único responsable de dirigir a la proteína a la membrana. Por ejemplo, las formas mutantes Rot1-26-149 y Rot1-26-199 que carecen de la región 200-228, se glicosilaron y localizaron correctamente en la membrana del retículo endoplásmico. Estos resultados indican la existencia de otras regiones de la proteína diferentes al 200-228 que también pueden contribuir al direccionamiento de Rot1 al retículo endoplásmico. Una de estas regiones podría estar localizada entre los residuos 26-60. Esta hipótesis se basa en que el mutante de delección Rot1-61-199 se deslocaliza y no se glicosila, mientras que al mutante Rot1-26-199 es glicosilado y se localiza perinuclearmente. La única diferencia entre estos dos mutantes es la presencia de la región aminoacídica 26-60.

Por lo tanto se puede concluir que para la proteína Rot1 existen al menos dos dominios que están implicados en el proceso de señalización: el localizado en la región 26-60 y el ubicado en la región 200-228. Nuestros análisis indican que estas dos regiones contienen señales topogénicas independientes que pueden ser funcionalmente redundantes. Por tanto, deleccionar solamente una de las regiones no elimina por completo la localización de la proteína en el retículo endoplasmático, aunque se localiza de forma menos eficiente que la proteína silvestre.

Se comprobó que cuando las regiones 26-60 y 200-228 se fusionan a proteínas reporteras, como la GFP, no son capaces de dirigir la proteína a las membranas del retículo endoplásmico (resultados no mostrados). Este hecho indicaría que estos dominios deben interactuar con secuencias adyacentes para dirigir la proteína al retículo. Se ha descrito que las secuencias señales son notablemente diversas, y numerosas observaciones en varios sistemas sugieren que estas secuencias no siempre son intercambiables. Es importante resaltar que existe un número considerable

de proteínas humanas que necesitan de una combinación de elementos topogénicos para conseguir una correcta localización subcelular (Lu *et al.* 1998; Heine *et al.* 2007). Desde este punto de vista, Rot1 vuelve a ser interesante ya que como se ha demostrado en este trabajo, esta proteína contiene varias de estas regiones que permiten que la proteína sea importada de manera eficiente al retículo endoplásmico probablemente a través de la interacción con otras proteínas que la presenten ante la maquinaria de translocación postraduccional de la célula.

Rot1 se inserta a la membrana del retículo endoplásmico a través del translocón Sec61 por medio de un mecanismo postraduccional que involucra al complejo Sec62/Sec63 (Juanes *et al.* 2008), un complejo que solo ha sido descrito en levaduras. Así pues, Rot1 difiere de las típicas proteínas de membrana tipo III (aquellas con una orientación N-terminal luminal), que emplean el mecanismo cotraduccional para translocarse al retículo endoplásmico (Goder & Spiess 2001). No obstante, el mecanismo postraduccional ha sido propuesto para un grupo de proteínas de membrana tipo III atípicas. Las proteínas del tipo III generalmente tienen un dominio N-terminal exoplásmico pequeño que se transloca fácilmente a través de la membrana. Sin embargo, existen proteínas con un dominio N-terminal mayor también orientado al lumen, tal como la ATPasa del aparato de Golgi Ynd1P (Zhong *et al.* 2005), la proteína C33H5.14 (Wang *et al.* 1998) y la proteína de rata NTAK (Higashiyama *et al.* 1997). Para estas proteínas, se ha sugerido la existencia de un mecanismo de translocación diferente (Zhong *et al.* 2005) que permite translocar extremos N-terminales grandes (desde 228 hasta 500 residuos) postraduccionalmente. Rot1 tiene un extremo N-terminal exoplásmico grande (228 residuos) y podría ser un ejemplo adicional de este incipiente grupo de proteínas.

### Degradación de la proteína Rot1

Previamente se había observado en nuestro grupo que la proteína Rot1 es relativamente inestable y que su degradación se lleva a cabo en el proteasoma (Juanes 2008). En el presente trabajo se decidió profundizar en el estudio del proceso de degradación de la proteína Rot1, aspecto que es interesante ya que mediante la degradación de proteínas, la célula controla los niveles y la actividad de éstas, además de eliminar las formas que estén mal plegadas y que generan problemas en el metabolismo celular.

Los resultados obtenidos demuestran que la proteína Rot1 se degrada a través de la ruta ERAD (*ER-associated (protein) degradation*), el sistema de degradación asociado al retículo endoplásmico. En general, el proceso de degradación intracelular de proteínas se lleva a cabo de forma secuencial por las enzimas de activación (E1), conjugación (E2) y ligasas (E3). En levaduras existe una única E1 (Uba1), 13 E2 (Ubc1-13), de las cuales solamente Ubc6 y Ubc7 se han relacionado con el sistema ERAD, donde forman complejos de degradación con las ligasas de ubiquitina E3 Hrd1 y Doa10. En el caso de Rot1, los resultados demuestran de forma muy clara que son Ubc6 y Ubc7 las E2 que participan en su degradación. Respecto a las E3, la degradación de Rot1 parece ser dependiente de la enzima Hrd1, ya que en mutantes en la ligasa Doa10 no se observan variaciones en la cinética de degradación de Rot1 con respecto a la forma silvestre. La participación de Hrd1 coincide con los mecanismos descritos para la ruta ERAD, puesto que esta ligasa de ubiquitina es la encargada de la degradación de sustratos que presentan dominios plegados incorrectamente que se localicen en el lumen (ERAD-L) o dentro de la membrana (ERAD-M) del retículo endoplásmico (Carvalho *et al.* 2006), lo que se corresponde con la localización subcelular de Rot1. Ahora bien, la degradación de la proteína Rot1 nativa implica que, además de esta función, Hrd1 esté participando en la degradación de una proteína que no necesariamente está mal plegada, como en el caso de Rot1, lo que sugiere una novedosa ampliación del tipo de sustratos que admite esta ligasa.

Por lo que respecta a la región de la proteína Rot1 que es reconocida por la maquinaria de degradación, los resultados de este trabajo sugieren que los residuos 1-25 pueden estar implicados en dicho proceso, aunque ésta región no sea la única. Más experimentos deben realizarse para establecer de forma clara cual es la(s) secuencia(s) necesaria(s) para que la maquinaria celular reconozca a la proteína, aportando así información a la ruta ERAD en general, puesto que el mecanismo ERAD-M aun no ha sido completamente caracterizado (Zattas & Hochstrasser 2015).

### **Interacciones de la proteína de membrana Rot1**

Una de las estrategias para descubrir cual es la función de una proteína en una célula es determinar con qué otras proteínas esta interaccionando (interactoma), ya que así se puede obtener un mapa más preciso de los procesos celulares en los que esté participando o incluso de los complejos macromoleculares de los que forme parte. Sin embargo, la manipulación de proteínas de membrana presenta el obstáculo de su naturaleza hidrofóbica, que implica que los métodos comúnmente usados en la determinación de interacciones entre proteínas solubles deben ser optimizados, con la adición de detergentes llegando muchas veces a condiciones en las cuales su solubilización de las membranas lipídicas desestabiliza los complejos en los que estén implicadas las proteínas de interés.

Los resultados publicados apuntan a una función de Rot1 diversa, ya que existen evidencias que la implican en el metabolismo de la pared celular (Machi *et al.* 2004), la regulación de la ciclina Clb2 (Juanes *et al.* 2007) y actuando como chaperona junto a Kar2 (Takeuchi *et al.* 2008), aunque en ninguno de estos casos se ha establecido el mecanismo molecular de la participación de Rot1 en estos procesos. En la presente Tesis nos propusimos como objetivo buscar proteínas que se asocian con

Rot1 poniendo a punto protocolos experimentales que utilizan condiciones óptimas para mantener lo más intacta posible su red de interacciones.

En primer lugar, dado que existen varios ejemplos en los que la formación de homodímeros u oligómeros son parte de una etapa necesaria para que las proteínas funcionen correctamente (Lemmon *et al.* 1992; Gurevich & Gurevich 2008), nos propusimos analizar la formación de complejos homoméricos de Rot1. Se realizaron para ello dos aproximaciones experimentales: por un lado se utilizó un sistema genético (ToxCAT), que se llevó a cabo en membranas naturales en un sistema heterólogo y por otro, se utilizaron ensayos de coinmunoprecipitación de extractos de levadura. En ambos casos se obtuvieron resultados que sugieren que la proteína Rot1 no forma oligómeros en *S. cerevisiae*.

A continuación se decidió adoptar una aproximación “ómica”. En *S. cerevisiae* se había descrito un mapa global de las interacciones del proteoma soluble empleando la purificación por afinidad en tándem (TAP), asociado a la espectrometría de masas (Krogan *et al.* 2006). En 2012, se publicó la adaptación de esta técnica para evaluar el proteoma de membrana en *S. cerevisiae* (Babu *et al.* 2012). En esta tesis se decidió analizar el interactoma de Rot1 reproduciendo el análisis adaptado para proteínas de membranas, pero enfocándolo específicamente en la purificación de la proteína Rot1.

En nuestro ensayo de TAP después de eliminar proteínas contaminantes, frecuentes en este tipo de análisis, se lograron detectar 72 posibles proteínas interactoras. Se encontró como la principal candidata a una interacción putativa con Rot1 a la proteína Def1. Def1 es una proteína que se requiere en el proceso de degradación de la RNA polimerasa II como respuesta al daño de DNA (Woudstra *et al.* 2002). Este resultado es llamativo puesto que Def1 no comparte con Rot1 ni localización celular ni función metabólica. Dado que los datos obtenidos eran muy sólidos, se intentó confirmar la interacción física de una manera directa a través de coinmunoprecipitación, pero los resultados obtenidos fueron negativos.



En la adaptación del TAP para proteínas de membranas realizada se utilizó Triton X-100 al 1% para la solubilización de las proteínas. En los experimentos de co-inmunoprecipitación de este trabajo, a pesar de emplear un rango de concentraciones de Triton X-100 (0,1-1%), no se pudo detectar la proteína Def1. Por tanto, al no poder confirmar los resultados del TAP sobre la interacción de Rot1 y Def1, es probable que la interacción detectada sea un falso positivo debido a interacciones inespecíficas. Es posible que los dos pasos secuenciales de purificación de los que consta la técnica no sean suficientemente eficaces en la reducción de proteínas contaminantes o inespecíficas, sobre todo en los complejos de proteínas de membrana, que al estar embebidas en la bicapa lipídica, se pueden generar agregados artificiales o inespecíficos. Sin embargo, es importante resaltar que al realizar la purificación por TAP en el ensayo control en ausencia de la proteína Rot1 etiquetada, la proteína Def1 no fue detectada.

También es necesario considerar que cuando las interacciones proteicas son débiles y transitorias o son dependientes de la fase de crecimiento celular, son muy difíciles de detectar. En estos casos, la literatura recomienda realizar un entrecruzamiento *in vivo* antes de la copurificación (Rohila *et al.* 2004). En nuestro caso, al añadir formaldehído a los cultivos celulares, tampoco se pudo detectar la interacción con Def1 (resultados no mostrados).

Se obtuvieron observaciones similares en cuanto a la interacción de Rot1 con Spt5, la segunda proteína detectada en el análisis por espectrometría de masas. Al igual que con Def1, la interacción detectada por TAP no pudo ser confirmada por coimmunoprecipitación.

Sin embargo, estas no fueron las únicas proteínas detectadas en el ensayo TAP. Otras interacciones esperadas como la previamente descrita por Takeuchi 2006 entre Rot1 y la chaperona Kar2/BiP (y que aparece en el análisis por TAP en la posición 67) sí que pudo ser comprobada directamente por coimmunoprecipitación.

Otra de las proteínas que debería aparecer en el análisis del TAP es Sec62, proteína implicada en la maquinaria de la inserción/translocación postraducciona. Extrañamente, esta proteína no aparece en nuestro análisis por TAP (Tabla 6.1). En cambio, al inmunoprecipitar la proteína Rot1, se observa de forma clara la interacción física entre Rot1 y Sec62. Puesto que previamente se había descrito a Rot1 como una proteína que se transloca al retículo endoplásmico por medio de la maquinaria postraducciona (Juanes *et al.*, 2008), la interacción de Rot1 y Sec62 era un resultado esperado y que se confirma por estos análisis como una interacción real y estable. Esta interacción física y directa hasta ahora no se había observado. El porque no se detecta Sec62 en la purificación por TAP es de difícil respuesta.

Al comparar nuestros resultados con el análisis masivo del proteoma de membrana realizado por Babu *et al.*, 2012, es importante destacar que en sus análisis Rot1 es identificada y purificada, pero los autores no encuentran ninguna proteína que interaccione con ella, mientras que en la presente Tesis se pudieron establecer mediante coimmunoprecipitaciones al menos dos interacciones con Rot1: las proteínas Kar2 y Sec62.

Otro aspecto importante a resaltar en la identificación por espectrometría de masas, tanto en el análisis de Babu *et al.*, 2012 como en el de este trabajo, es que solo se identificó un péptido de la proteína Rot1. Esto es notable porque generalmente en la fracción purificada, la proteína de interés se encuentra enriquecida y se detecta una mayor cantidad de péptidos. Una de las posibles razones que justifica que no se detecten algunos de los péptidos predichos para Rot1, es la asignación dificultada debido por las glicosilaciones que sufre la proteína. De todas las modificaciones postraduccionales, la glicosilación es una de las mas problemáticas para la espectrometría de masas debido a la variabilidad de los glicanos añadidos y a la naturaleza a menudo isobárica de estos. Esto provoca que los tamaños moleculares de los péptidos puedan alterarse y no

incluirse dentro del rango de asignación y determinación de las secuencias peptídicas (Parker *et al.* 2010). El hecho de que los demás péptidos no sean detectados podría deberse a otras causas, aunque como se mostró en el apartado de Resultados, la identificación de un solo péptido para la proteína (el correspondiente a la secuencia QLFSDPCNDDGVSTYSR) es bastante consistente con lo observado en el trabajo de Babu *et al.*, 2012 y en la base de datos *Peptide Atlas* (Tabla 6.3 y Figura 6.6).

En conclusión, nuestros resultados ejemplifican las limitaciones experimentales que todavía existen a la hora de aislar complejos o de detectar interacciones entre proteínas de membranas.



## 8. Conclusiones

---

1. La proteína Rot1 presenta un dominio transmembrana (TM) C-terminal, correspondiente a la región 237-256, que permite a la proteína anclarse de manera integral en la membrana con una orientación N-terminal luminal.
2. El dominio TM de la proteína Rot1 es necesario para el anclaje a la membrana del retículo endoplásmico (RE), pero además tiene un papel esencial en la función de la proteína y por ende, en la viabilidad celular.
3. El residuo Ser250 del dominio TM es un aminoácido esencial para la viabilidad celular. Sin embargo, este residuo no está implicado ni en la translocación y anclaje de la proteína a la membrana del RE ni en su glicosilación.
4. La importancia del residuo Ser250 radica en el grupo hidroxilo de su cadena lateral, el cual podría estar implicado en la formación de

## *Conclusiones*

---

puentes de hidrógeno. Esto se ve respaldado por el alto nivel de conservación de este residuo en diferentes formas homólogas de Rot1 en otras especies de levaduras.

5. La ubicación precisa del residuo Ser250 en la hélice TM es necesaria para la viabilidad celular.
6. La proteína Rot1 no presenta una secuencia señal típica de translocación. Existen dos secuencias internas ubicadas en las regiones 26-60 y 200-228, que contribuyen de manera cooperativa y redundante en el proceso de direccionamiento a la membrana del RE.
7. La proteína Rot1 se degrada a través de la ruta ERAD, mediante el complejo Hrd1, empleando las enzimas del sistema E2 Ubc6 y Ubc7.
8. Se ha demostrado que la proteína Rot1 interacciona de forma directa con la chaperona del retículo endoplásmico Kar2 y con Sec62, un componente de la maquinaria de translocación postraducciona en levaduras.

## 9. Bibliografía

---

- Adamian, L. & Liang, J., 2002. Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 47(2), pp.209–218.
- Arakawa, M. et al., 2011. Structural and functional roles of small group-conserved amino acids present on helix-H7 in the  $\beta(2)$ -adrenergic receptor. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(4), pp.1170–1178.
- Ast, T. & Schuldiner, M., 2013. All roads lead to Rome (but some may be harder to travel): SRP-independent translocation into the endoplasmic reticulum. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(3), pp. 273-288.
- Babu, M. et al., 2012. Interaction landscape of membrane-protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, pp.1–6.
- Baeza-Delgado, C., Marti-Renom, M.A. & Mingarro, I., 2013. Structure-based statistical analysis of transmembrane helices. *European biophysics journal*, 42(2-3), pp.199–207.
- Bañó-Polo, M. et al., 2012. Polar/Ionizable Residues in Transmembrane Segments: Effects on Helix-Helix Packing. *PLoS ONE*, 7(9), p.e44263.
- Bañó-Polo, M. et al., 2013. Charge pair interactions in transmembrane helices and turn propensity of the connecting sequence promote helical hairpin insertion. *Journal of molecular biology*, 425(4), pp.830–840.

## Bibliografía

---

- Bays, N. W. et al., 2001. Hrd1p/Der3p is a membrane anchored ubiquitin ligase for ER-associated degradation. *Nature Cell Biology*, 3, pp. 24-29.
- Becker, T. et al., 2009. Structure of Monomeric Yeast and Mammalian Sec61 Complexes Interacting with the Translating Ribosome. *Science*, 326(5958), pp.1369–1373.
- Bellí, G. et al., 1998. Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast*, 14(12), pp.1127–1138.
- Bickle, M. et al., 1998. Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *The EMBO journal*, 17(8), pp.2235–2245.
- Bogdanov, M., Heacock, P.N. & Dowhan, W., 2002. A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *The EMBO journal*.
- Bonifacino, J.S. & Weissman, A.M., 1998. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14, pp.19–57.
- Borgese, N. et al., 2003. Biogenesis of tail-anchored proteins. *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 6), pp.1238–1242.
- Bowie, J.U., 1997. Helix packing in membrane proteins. *Journal of molecular biology*, 272(5), pp.780–789.
- Carvalho, P., Goder, V. & Rapoport, T.A., 2006. Distinct Ubiquitin-Ligase Complexes Define Convergent Pathways for the Degradation of ER Proteins. *Cell*, 126(2), pp.361–373.
- Casey, P.J., 1995. Protein lipidation in cell signaling. *Science*, 268(5208), pp.221–225.
- Chavan, M., Yan, A. & Lennarz, W.J., 2005. Subunits of the Translocon Interact with Components of the Oligosaccharyl Transferase Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), pp.22917–22924.
- Chelikani, P. et al., 2007. Role of group-conserved residues in the helical core of beta2-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(17), pp.7027–7032.
- Chin, C.-N. & Heijne, von, G., 2000. Charge pair interactions in a model transmembrane helix in the ER membrane. *Journal of molecular biology*, 303(1), pp.1–5.



- Choma, C. et al., 2000. Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nature structural biology*, 7(2), pp.161–166.
- Chou, K.C. & Elrod, D.W., 1999. Prediction of membrane protein types and subcellular locations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 34(1), pp.137–153.
- Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Protein Degradation.
- Costanzo, M. et al., 2010. The Genetic Landscape of a Cell. *Science*, 327(5964), pp.425–431.
- Cserző, M. et al., 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein engineering*, 10(6), pp.673–676.
- Curran, A.R. & Engelman, D.M., 2003. Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(4), pp.412–417.
- Dawson, J.P., Weinger, J.S. & Engelman, D.M., 2002. Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices. *Journal of molecular biology*, 316(3), pp.799–805.
- Dempski Jr, R.E. & Imperiali, B., 2002. Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(6), pp.844–850.
- Duina, A.A., Miller, M.E. & Keeney, J.B., 2014. Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. *Genetics*, 197(1), pp.33–48.
- Dukkipati, A. et al., 2001. Serine 85 in transmembrane helix 2 of short-wavelength visual pigments interacts with the retinylidene Schiff base counterion. *Biochemistry*, 40(50), pp.15098–15108.
- Engel, A. & Gaub, H.E., 2008. Structure and Mechanics of Membrane Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), pp.127–148.
- Engelman, D.M. et al., 2003. Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS letters*, 555(1), pp.122–125.
- Fewell, S.W. et al., 2001. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annual review of genetics*, 35, pp.149–191.
- Gietz, R.D. et al., 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11(4), pp.355–360.

## Bibliografia

---

- Goder, V. & Spiess, M., 2001. Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS letters*, 504(3), pp.87–93.
- Goder, V., Junne, T. & Spiess, M., 2004. Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), pp.1470–1478.
- Goffeau, A. et al., 1996. Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), pp.546–563–7.
- Görlich, D. & Rapoport, T.A., 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 75(4), pp.615–630.
- Granseth, E., Heijne, von, G. & Elofsson, A., 2005. A Study of the Membrane–Water Interface Region of Membrane Proteins. *Journal of molecular biology*, 346(1), pp.377–385.
- Gratkowski, H., Lear, J.D. & DeGrado, W.F., 2001. Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), pp.880–885.
- Grudnik, P., Bange, G. & Sinning, I., 2009. Protein targeting by the signal recognition particle. *Biological chemistry*, 390(8), pp.775–782.
- Gurevich, V.V. & Gurevich, E.V., 2008. How and why do GPCRs dimerize? *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(5), pp.234–240.
- Hamman, B.D. et al., 1997. The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40–60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell*, 89(4), pp.535–544.
- Hegde, R.S. & Keenan, R.J., 2011. Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(12), pp.787–798.
- Heijne, von, G., 1992. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *Journal of molecular biology*, 225(2), pp.487–494.
- Heine, C. et al., 2007. Topology and endoplasmic reticulum retention signals of the lysosomal storage disease-related membrane protein CLN6. *Molecular Membrane Biology*, 24(1), pp.74–87.
- Hessa, T. et al., 2007. Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. *Nature*, 450(7172), pp.1026–1030.
- Hessa, T. et al., 2005. Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature*, 433(7024), pp.377–381.

- Higashiyama, S. et al., 1997. A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4. *Journal of Biochemistry*, 122(3), pp.675–680.
- Higy, M., Junne, T. & Spiess, M., 2004. Topogenesis of Membrane Proteins at the Endoplasmic Reticulum. *Biochemistry*, 43(40), pp.12716–12722.
- Hochstrasser, M., 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual review of genetics*, 30(1), pp.405–439.
- Huber, L.A., 2003. Opinion: Is proteomics heading in the wrong direction? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(1), pp.74–80.
- Illergård, K., Kauko, A. & Elofsson, A., 2010. Why are polar residues within the membrane core evolutionary conserved? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(1), pp.79–91.
- Jaud, S. et al., 2009. Insertion of short transmembrane helices by the Sec61 translocon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), pp.11588–11593.
- Jiang, Y. et al., 2008. An interaction between the SRP receptor and the translocon is critical during cotranslational protein translocation. *The Journal of Cell Biology*, 6(5), p.476.
- Johnson, A.E. & van Waes, M.A., 1999. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15, pp.799–842.
- Jones, D.T., 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of molecular biology*, 292(2), pp.195–202.
- Juanes, M.A. et al., 2007. Rot1 plays an antagonistic role to Clb2 in actin cytoskeleton dynamics throughout the cell cycle. *Journal of Cell Science*, 120(14), pp.2390–2401.
- Juanes, M.A., 2008. Caracterització bioquímica y funcional de Rot1, una proteïna essencial de *Saccharomyces cerevisiae*. *Universitat de València Departament de Bioquímica i Biologia Molecular*.
- Juanes, M.A, Carlos Igual, J. & Carmen Bañó, M., 2008. Membrane topology and post-translational modification of the *Saccharomyces cerevisiae* essential protein Rot1. *Yeast*, 25(2), pp.93–106.
- Junne, T. et al., 2007. Mutations in the Sec61p channel affecting signal sequence recognition and membrane protein topology. *J Biol Chem*, 282(45), pp.33201–33209.

## Bibliografía

---

- Kalies, K.U., Rapoport, T.A. & Hartmann, E., 1998. The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *Journal of Cell Biology*, 141(4), pp.887–894.
- Kanner, E.M. et al., 2002. The Amino Terminus of Opsin Translocates “Posttranslationally” as Efficiently as Cotranslationally. *Biochemistry*, 41(24), pp.7707–7715.
- Kawaguchi, S. & Ng, D.T.W., 2007. SnapShot: ER-Associated Protein Degradation Pathways. *Cell*, 129(6), pp.1230.e1–1230.e2.
- Keenan, R.J. et al., 2001. The signal recognition particle. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), pp.755–775.
- Kelleher, D.J., 2005. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*, 16(4), pp.47R–62R.
- Kim, S. et al., 2005. Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), pp.14278–14283.
- Krishnakumar, S.S. & London, E., 2007. The control of transmembrane helix transverse position in membranes by hydrophilic residues. *Journal of molecular biology*, 374(5), pp.1251–1269.
- Krogan, N.J. et al., 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 440(7084), pp.637–643.
- Krogh, A. et al., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305(3), pp.567–580.
- Lemmon, M.A. et al., 1992. Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices. *Biochemistry*, 31(51), pp.12719–12725.
- Lemus, L. & Goder, V., 2014. Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin. *Cells*, 3(3), pp.824–847.
- Levy, R., Wiedmann, M. & Kreibich, G., 2001. In Vitro Binding of Ribosomes to the Subunit of the Sec61p Protein Translocation Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 276(4), pp.2340–2346.
- Longtine, M.S. et al., 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(10), pp.953–961.

- Lu, Y. et al., 1998. Co- and posttranslational translocation mechanisms direct cystic fibrosis transmembrane conductance regulator N terminus transmembrane assembly. *J Biol Chem*, 273(1), pp.568–576.
- Lundin, C. et al., 2008. Molecular code for protein insertion in the endoplasmic reticulum membrane is similar for Nin–Cout and Nout–Cin transmembrane helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), pp.15702–15707.
- Machi, K. et al., 2004. Rot1p of *Saccharomyces cerevisiae* is a putative membrane protein required for normal levels of the cell wall 1,6-beta-glucan. *Microbiology*, 150(Pt 10), pp.3163–3173.
- Martínez-Gil, L. et al., 2011. Membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *The FEBS journal*, 278(20), pp.3846–3858.
- Matsumoto, S., Shimada, A. & Nyirenda, J., 2013. Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(44), pp.17868–17873.
- Ménétret, J.-F. et al., 2008. Single Copies of Sec61 and TRAP Associate with a Nontranslating Mammalian Ribosome. *Structure*, 16(7), pp.1126–1137.
- Miller, J.P. et al., 2005. Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), pp.12123–12128.
- Mingarro, I. et al., 1996. Ala-insertion scanning mutagenesis of the glycoporphin A transmembrane helix: a rapid way to map helix-helix interactions in integral membrane proteins. *Protein science*, 5(7), pp.1339–1341.
- Mingarro, I. et al., 2000. Different conformations of nascent polypeptides during translocation across the ER membrane. *BMC cell biology*, 1, p.3.
- Mitra, N. et al., 2006. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends in biochemical sciences*, 31(3), pp.156–163.
- Mothes, W., Prehn, S. & Rapoport, T.A., 1994. Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *The EMBO journal*, 13(17), pp.3973–3982.
- Nelson, L.D., Johnson, A.E. & London, E., 2008. How Interaction of Perfringolysin O with Membranes Is Controlled by Sterol Structure, Lipid Structure, and Physiological Low pH: insights into the origin of perfringolysin o-lipid raft interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), pp.4632–4642.

## Bibliografía

---

- Ng, D.T., Brown, J.D. & Walter, P., 1996. Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of Cell Biology*, 134(2), pp.269–278.
- Nilsson, I. & Heijne, von, 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), pp.17338–17343.
- North, B. et al., 2006. Characterization of a Membrane Protein Folding Motif, the Ser Zipper, Using Designed Peptides. *Journal of molecular biology*, 359(4), pp.930–939.
- Nyathi, Y., Wilkinson, B.M. & Pool, M.R., 2013. Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(11), pp.2392–2402.
- Orzáez, M. et al., 2004. Influence of proline residues in transmembrane helix packing. *Journal of molecular biology*, 335(2), pp.631–640.
- Orzáez, M., Pérez-Payá, E. & Mingarro, I., 2000. Influence of the C-terminus of the glycophorin A transmembrane fragment on the dimerization process. *Protein science*, 9(6), pp.1246–1253.
- Papaloukas, C. et al., 2008. Estimating the length of transmembrane helices using Z-coordinate predictions. *Protein Science*, 17(2), pp.271–278.
- Parker, C.E. et al., 2010. Mass Spectrometry for Post-Translational Modifications. *Neuroproteomics*, Chapter 6.
- Pfeffer, S. et al., 2014. Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon. *Nature Communications*, 5, p. 3072. .
- Plath, K. & Rapoport, T.A., 2000. Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, 151(1), pp.167–178.
- Popot, J.L. & Engelman, D.M., 2000. Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annual Review of Biochemistry*, 69, pp.881–922.
- Rapoport, T.A. et al., 2004. Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends in cell biology*, 14(10), pp.568–575.
- Rapoport, T.A., 2007. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450(7170), pp.663–669.

- Resh, M.D., 1994. Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell*, 76(3), pp.411–413.
- Rohila, J.S. et al., 2004. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *The Plant Journal*, 38(1), pp.172–181.
- Rost, B., Fariselli, P. & Casadio, R., 1996. Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein science*, 5(8), pp.1704–1718.
- Russ, W.P. & Engelman, D.M., 2000. The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. *Journal of molecular biology*, 296(3), pp.911–919.
- Russ, W.P. & Engelman, D.M., 1999. TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), pp.863–868.
- Saurí, A. et al., 2009. Viral membrane protein topology is dictated by multiple determinants in its sequence. *Journal of molecular biology*, 387(1), pp.113–128.
- Senes, A., Gerstein, M. & Engelman, D.M., 2000. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *Journal of molecular biology*, 296(3), pp.921–936.
- Shao, S. & Hegde, R.S., 2011. Membrane Protein Insertion at the Endoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27(1), pp.25–56.
- Stefansson, A. et al., 2004. Determination of N- and C-terminal Borders of the Transmembrane Domain of Integrin Subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), pp.21200–21205.
- Takeuchi, M., 2006. Saccharomyces cerevisiae Rot1p Is an ER-Localized Membrane Protein That May Function with BiP/Kar2p in Protein Folding. *Journal of Biochemistry*, 139(3), pp.597–605.
- Takeuchi, M., Kimata, Y. & Kohno, K., 2008. Saccharomyces cerevisiae Rot1 Is an Essential Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, 19(8), pp.3514–3525.
- Tamborero, S. et al., 2011. Membrane Insertion and Topology of the Translocating Chain-Associating Membrane Protein (TRAM). *Journal of molecular biology*, 406(4), pp.571–582.

## Bibliografía

---

- Tamura, K. et al., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), pp.2731–2739.
- Tarassov, K. et al., 2008. An in Vivo Map of the Yeast Protein Interactome. *Science*, 320(5882), pp.1465–1470.
- Teese, M.G. & Langosch, D., 2015. Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions. *Biochemistry*, 54(33), pp.5125–5135.
- Ulmschneider, M.B. & Sansom, M.S., 2001. Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochimica et biophysica acta*, 1512(1), pp.1–14.
- van den Berg, B. et al., 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, 427(6969), pp.36–44.
- van Meer, G., Voelker, D.R. & Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2), pp.112–124.
- Viklund, H. et al., 2008. SPOCTOPUS: a combined predictor of signal peptides and membrane protein topology. *Bioinformatics*, 24(24), pp.2928–2929.
- Wang, T.F., Ou, Y. & Guidotti, G., 1998. The transmembrane domains of ectoapayrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J Biol Chem*, 273(38), pp.24814–24821.
- Wattenberg, B. & Lithgow, T., 2001. Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. *Traffic*, 2(1), pp.66–71.
- Weerapana, E., 2006. Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology*, 16(6), pp.91R–101R.
- White, S.H., & Wimley, W.C., 1999. Membrane protein folding and stability: Physical Principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, pp.319–365.
- Whitley, P. & Mingarro, I., 2014. Stitching proteins into membranes, not sew simple. *Biological chemistry*, 395(12), pp.1417–1424.
- Wiener, M.C. & White, S.H., 1992. Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure. *Biophysical journal*, 61(2), pp.434–447.
- Wimley, W.C., 2003. The versatile beta-barrel membrane protein. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(4), pp.404–411.



- Woolhead, C.A., McCormick, P.J. & Johnson, A.E., 2004. Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. *Cell*, 116(5), pp.725–736.
- Woudstra, E.C. et al., 2002. A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature*, 415(6874), pp.929–933.
- Xu, X. et al., 2010. Protein Expression and Purification. *Protein Expression and Purification*, 72(2), pp.149–156.
- Zattas, D. & Hochstrasser, M., 2015. Ubiquitin-dependent protein degradation at the yeast endoplasmic reticulum and nuclear envelope. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 50(1), pp.1–17.
- Zhang, D.-W. et al., 2003. Characterization of the role of polar amino acid residues within predicted transmembrane helix 17 in determining the substrate specificity of multidrug resistance protein 3. *Biochemistry*, 42(33), pp.9989–10000.
- Zheng, N. & Gierasch, L.M., 1996. Signal sequences: the same yet different. *Cell*, 86(6), pp.849–852.
- Zhong, X. & Guidotti, G., 1999. A Yeast Golgi E-type ATPase with an Unusual Membrane Topology. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), pp.32704–32711.
- Zhong, X., Malhotra, R. & Guidotti, G., 2005. A eukaryotic carboxyl-terminal signal sequence translocating large hydrophilic domains across membranes. *FEBS letters*, 579(25), pp.5643–5650.
- Zhou, F.X. et al., 2000. Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nature structural biology*, 7(2), pp.154–160.
- Zhou, F.X. et al., 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), pp.2250–2255.



## **10. Anexos**

---



Biochem. J. (2014) 458, 239–249 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20131306



239

## A transmembrane serine residue in the Rot1 protein is essential for yeast cell viability

Carlos A. MARTÍNEZ-GARAY\*, M. Angeles JUANES\*<sup>1</sup>, J. Carlos IGUAL\*, Ismael MINGARRO\*<sup>2</sup> and M. Carmen BAÑO\*<sup>2</sup>

\*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València, Burjassot, Spain

Polar residues are present in TM (transmembrane) helices and may influence the folding or association of membrane proteins. In the present study, we use an *in vivo* approach to analyse the functional and structural roles for amino acids in membrane-spanning motifs using the Rot1 (reversal of Tor2 lethality 1) protein as a model. Rot1 is an essential membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae* and it contains a single TM domain. An alanine insertion scanning analysis of this TM helix revealed that the integrity of the central domain is essential for protein function. We identified a critical serine residue inside the helix that plays an essential role in maintaining cell viability in *S. cerevisiae*. Replacement of the serine residue at position 250 with

a broad variety of amino acids did not affect protein targeting and location, but completely disrupted protein function causing cell death. Interestingly, substitution of the serine residue by threonine resulted in sustained cell viability, demonstrating that the hydroxy group of the TM serine side chain plays a critical role in protein function. The results of the present study indicate that Rot1 needs the TM Ser<sup>250</sup> to interact with other membrane components and exert its functional role, avoiding exposure of the serine hydrogen-bonding group at the lipid-exposed surface.

**Key words:** cell viability, essential serine, hydrogen bond, reversal of Tor2 lethality 1 (Rot1), transmembrane polar residues, yeast.

### INTRODUCTION

Membrane proteins represent more than one-fourth of all genome-encoded proteins [1] and play an important role in cell biology and physiology, carrying out many essential cell functions. As membrane protein functions have to be tightly co-ordinated to ensure the survival of every cell and every organism, mutations that cause membrane protein misfolding or impair interactions with other membrane components may compromise cell survival. Most membrane proteins span the membrane with an  $\alpha$ -helical conformation of the polypeptide chain and are often organized into functional complexes, forming homo-oligomeric and/or hetero-oligomeric assemblies [2]. In these proteins, TM (transmembrane)  $\alpha$ -helices are characterized by long stretches of hydrophobic residues with few or no polar side chains. Rather than serving merely as featureless hydrophobic stretches required to anchor proteins to membranes, these TM domains have structural and/or functional roles well beyond this canonical capacity, such as facilitating interactions with other membrane proteins. The driving forces that stabilize these interactions are generally packing effects (van der Waals interactions) and interhelical polar interactions (hydrogen bonds and ion pairs) [3] between closely packed helices.

Considering the individual TM  $\alpha$ -helices as independently folded units allows the study of membrane protein assembly. Micelles and lipid bilayers have been used together with synthetic peptides and chimaeric proteins containing designed TM helices to study the influence of different residues or motifs in the structure and function of these TM domains [4,5]. These studies revealed that polar amino acids in the TM helices play critical roles in the association and folding of membrane proteins through the formation of side chain–side chain interhelical hydrogen bonds within the membrane environment [6]. Sequence analysis

of high-resolution membrane protein structures has shown that serine and threonine residues are found in TM helices more frequently than other polar residues (i.e. asparagine, glutamine, histidine, aspartic acid, glutamine, arginine and lysine) [7], partially because of their potential to form hydrogen bonds with main-chain carbonyl oxygens [8]. Such hydrogen bonding may have important consequences for the function, conformational specificity and thermodynamic stability of membrane proteins. Using randomized libraries of TM interfaces, it has been found that serine/threonine motifs exhibit an ability to drive the association of TM helices, stabilizing the formation of helical oligomers [9,10]. Recently, the presence of serine/threonine motifs in TM helices has been shown in MD simulations and bioinformatic analyses to have significant implications on local membrane protein structure and dynamics [11].

Despite the information obtained using *in vitro* approaches in structure-based analyses of TM helices, studies in complex living cells, such as eukaryotic cells, are sparse. In the present study, we analysed the amino acid sequence requirements of the single C-terminal hydrophobic domain of the yeast Rot1 (reversal of Tor2 lethality 1) protein in order to identify the amino acids responsible for TM helix function using an *in vivo* model system. Rot1 is an essential protein in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This protein is involved in several cellular functions, including protein folding, cell wall biosynthesis, actin cytoskeleton dynamics and cell-cycle control [12]. Rot1 is located primarily at the ER (endoplasmic reticulum)–nuclear membrane, facing the lumen, and is anchored to the membrane by a single C-terminal hydrophobic region [13]. In the present study, we analysed the role of the residues included in this hydrophobic region. A systematic mutagenesis study of the TM domain was performed. Although a single polar serine residue at position 250 appears to be critical for cell viability, other polar

Abbreviations: CAT, chloramphenicol acetyltransferase; endo H, endoglycosidase H; ER, endoplasmic reticulum; HA, haemagglutinin; HR, hydrophobic region; Lep, leader peptidase; MBP, maltose-binding protein; PK, proteinase K; RM, rough microsomal membrane; Rot1, reversal of Tor2 lethality 1; TM, transmembrane.

<sup>1</sup> Present address: Centre de Recherche en Biochimie Macromoléculaire, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier, France.

<sup>2</sup> Correspondence may be addressed to either of these authors (ismael.mingarro@uv.es or m.carmen.bano@uv.es).

residues, such as Thr<sup>234</sup>, Asn<sup>236</sup>, Ser<sup>235</sup> and Ser<sup>242</sup>, do not affect cell survival. Therefore Ser<sup>250</sup> is critical for proper protein function and crucial for cell viability.

## MATERIALS AND METHODS

### Yeast strains, genetic methods and plasmids

To obtain the yeast strains used in the present study, the *ROT1* promoter was substituted with the *tetO<sub>2</sub>* promoter in the strain JCY216 by integrating a DNA fragment amplified from the plasmid pCM225 [14]. A centromeric plasmid containing *ROT1* was constructed by cloning a PCR-amplified fragment from positions -430 to +955 of the *ROT1* gene into an EcoRI-BamHI-cleaved pRS314 vector. Construction of the plasmid pROT1-HA-CEN, which contains a sequence encoding three copies of the HA (haemagglutinin) epitope, was described previously [13]. A PCR-amplified fragment (using the pROT1-HA-CEN plasmid as a template) from positions -430 to +684 of the *ROT1* gene was cloned into EcoRI-XhoI-cleaved pRS314 to obtain the plasmid pROT1-HA<sup>Δ229-256</sup>-CEN. In contrast, pROT1-HA<sup>Δ229-256-18L</sup> was constructed in two steps. First, a PCR-amplified fragment from positions -430 to +684 of the *ROT1* gene was cloned into the YCplac50 vector. Secondly, a DNA fragment covering positions +722 to +955 of the *ROT1* gene, which was obtained by PCR amplification using a forward primer containing the sequence coding for the poly-leucine tail (18L), was cloned in-frame in the previous plasmid.

The plasmid encoding the TM domain sequence of *ROT1* was constructed by subcloning the TM domain into the pGEM1 vector between the KpnI and SpeI restriction sites using the PCR-amplified *ROT1* sequence containing positions +709 to +768 and primers containing the appropriate restriction sites. The PCR product was digested and ligated to the Lep (leader peptidase) vector to obtain a construct containing the P2 domain of the *Escherichia coli* Lep fused in-frame at the C-terminus.

The TM domain corresponding to residues 237–256 of Rot1 were PCR-amplified using primers containing positions +709 to +768 and digested with the BamHI and NheI restriction enzymes. The fragment was cloned into the BamHI-NheI sites of the pccKAN vector to obtain the construct in-frame with the MBP (maltose-binding protein) domain at the N-terminus and ToxR at the C-terminus.

Cells were grown in standard YPD medium [1% (w/v) yeast extract/2% (w/v) peptone/2% (w/v) glucose] or SD (synthetic dextrose) medium [0.67% yeast nitrogen base, synthetic complete mixture (drop out) and 2% glucose] and supplemented as required. To fully repress the *tetO<sub>2</sub>* promoter, doxycycline (Sigma) was added to a final concentration of 10 μg/ml. For growth assays, 10-fold serial dilutions in growth medium were prepared from an exponentially growing culture (5 × 10<sup>6</sup> cells/ml). A total of 5 μl of each dilution was spotted on to the appropriate medium and the plates were incubated at 25 °C.

### Protein expression *in vitro*

Wild-type and *ROT1* constructs were transcribed and translated in the TNT<sup>®</sup> SP6 Quick Coupled system (Promega). DNA template (75 ng), [<sup>35</sup>S]methionine/cysteine (5 μCi) and 1 μl of dog pancreas RMs (rough microsomal membranes; tRNA Probes) were added to 5 μl of lysate and the samples were incubated for 90 min at 30 °C. The translation reaction mixture was diluted in 5 volumes of PBS (pH 7.4). The membranes were collected by layering the supernatant on to a 50 μl sucrose cushion and

centrifugation at 100 000 g for 20 min at 4 °C in a Beckman table top ultracentrifuge with a TLA-55 rotor. The pellets were analysed by SDS/PAGE (12% gel) and the gels visualized on a Fuji FLA3000 Phosphor Imager using the ImageGauge.

### Western blot analysis

Approximately 10<sup>8</sup> cells were collected and resuspended in 100 μl of water. After adding 100 μl of 0.2 M NaOH, the cells were incubated for 10 min at room temperature (25 °C). Cells were collected by centrifugation (9000 g for 1 min at 25 °C), resuspended in 50 μl of sample buffer and incubated for 5 min at 95 °C. Extracts were clarified by centrifugation (800 g for 10 min at 4 °C) and equivalent amounts of protein resolved by SDS/PAGE (10% gel). After transferring on to nitrocellulose filters, tagged proteins were detected using the corresponding antibody (anti-HA 3F10 monoclonal antibody from Roche) and the ECL Advance Western blotting detection kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions.

### Indirect immunofluorescence

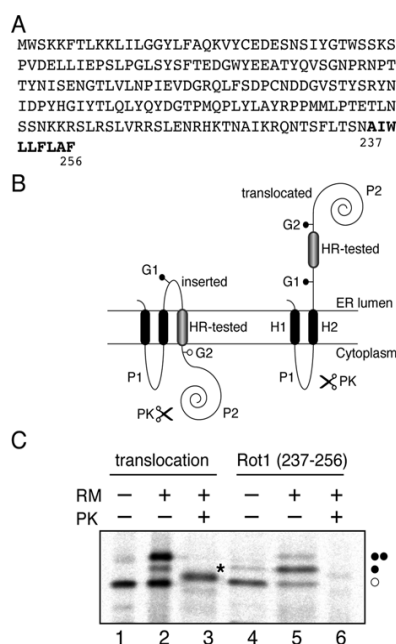
Approximately 10<sup>8</sup> cells were collected and fixed in buffer A [0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.4)] with 37% formaldehyde (1:10 dilution) for 120 min with agitation. The cells were then collected, washed with buffer B (buffer A plus 1.2 M sorbitol) and incubated in 0.5 ml of buffer B containing 0.1% 2-mercaptoethanol and 200 μg of Zymolyase<sup>®</sup> (20-T/ml) at 37 °C for 15 min. Spheroplasts were collected and washed with buffer B. An aliquot (5–10 μl) was applied to multitest slide wells, blocked with PBS containing 0.1% BSA for 20 min at 4 °C, resuspended in 10 μl of a solution of 0.4 μg/ml anti-HA antibody 3F10 and incubated for 2 h at 4 °C. After washing with PBS/BSA, the secondary antibody (Alexa Fluor<sup>™</sup> 546-labelled anti-rat antibody; Molecular Probes) was added. DNA was stained at the end of the process by incubating spheroplasts in PBS containing 1 μg/ml of DAPI (Sigma). Samples were analysed using an Axioskop 2 fluorescence microscope (Zeiss) and pictures were taken with a SPOT digital camera (Diagnostic Instruments).

### Endoglycosidase treatment

Approximately 10<sup>8</sup> cells were resuspended in 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) supplemented with a mixture of protease inhibitors and broken with vigorous shaking in the presence of glass beads. The lysate was removed from the intact cells and the debris by centrifuged 2000 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was denatured by adding 1 volume of denaturation buffer [1 mM Tris/HCl (pH 7.5), 40 mM DTT and 0.5% SDS] and incubated for 5 min at 95 °C. Samples were diluted 2-fold (final concentration 0.25% SDS) and adjusted to a final concentration of 0.2 mM ammonium acetate (pH 5.5). The sample was divided into two aliquots: one was treated with 50 milliunits of endo H (endoglycosidase H; Roche) and the other incubated with buffer at 37 °C for 2 h. Proteins were resolved by SDS/PAGE (10% gel) and immunoblotted.

### Subcellular fractionation

A crude cell extract was prepared in 0.1 M sorbitol, 50 mM potassium acetate, 20 mM Hepes (pH 7.5), 2 mM EDTA, 1 mM DTT and protease inhibitors with vigorous shaking of the cells in the presence of glass beads. Cell debris was pelleted at 700 g for 5 min and the supernatant divided into separate tubes, which were then subjected to one of the following treatments for 1 h on ice:



**Figure 1** Amino acid sequence and insertion of the transmembrane domain of Rot1

(A) Amino acid sequence of the Rot1 protein. The C-terminal TM domain is shown in bold. (B) Schematic representation of the engineered Lep model protein. Wild-type Lep has two TM helices (H1 and H2) and a large C-terminal luminal domain (P2). The protein inserts into the RM membranes in an N-terminal–C-terminal ER luminal orientation. The HR is inserted into the P2 domain, flanked by two glycosylation sites (G1 and G2). If the hydrophobic region is inserted into the membrane, only the G1 site is glycosylated (left-hand model), whereas if the sequence is translocated into the lumen of microsomes, both G1 and G2 sites are glycosylated (right-hand model). (C) *In vitro* translation in the presence of RM membranes of Lep constructs. The TM domain of Rot1 was translated in the presence of membranes and PK as indicated (lanes 4–6), and a control hydrophobic region was used to verify sequence translocation (lanes 1–3). ○ Non-glycosylated proteins; ● singly glycosylated proteins; ●● doubly glycosylated proteins; \* protected protein fragment.

buffer, 0.5 M NaCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.5), urea (2.5 M) or 1% Triton X-100 plus 0.5 M NaCl. After incubation, the samples were separated into supernatant and pellet fractions by centrifugation at 4°C for 1 h at 100 000 g (Beckman rotor TLA-55). Equivalent amounts of supernatant and pellet fractions were subjected to SDS/PAGE (10% gel) and detected by immunoblotting with anti-HA antibodies.

#### ToxCAT methods

Approximately 6.0 A<sub>420</sub> units of the *E. coli* NT326 strain cells (from Professor D.M. Engelman, Yale University, New Haven, CT, U.S.A.) were harvested by centrifugation and washed with 0.4 ml of sonication buffer [25 mM Tris/HCl and 2 mM EDTA (pH 8.0)]. The cells were resuspended in 2 ml of sonication buffer and lysed by probe sonication. After removing an aliquot (20 μl) for Western blot analysis, the remaining lysate was clarified by centrifugation at 13 000 g for 15 min and the supernatant stored on ice until the spectrophotometric assay was performed. All constructs conferred the ability to grow on maltose plates to the malE-deficient strain NT326, which indicates that proper membrane insertion of the ToxR–Rot1 TM–MBP fusion protein

occurred [15]. For maltose complementation assays, *E. coli* NT326 cells expressing ToxR–Rot1 TM–MBP constructs were streaked on M9 minimal media plates containing 0.4% maltose as the only carbon source and incubated for 3 days at 37°C. The self-association ability of the TM domain triggers the expression of a *CAT* (chloramphenicol acetyltransferase) gene reporter, and production of the *CAT* protein can be quantified using a CAT-ELISA kit (Roche Diagnostics). *CAT* measurements and construct expression measurements were performed in at least triplicate and normalized for the relative expression level of each construct by Western blotting.

#### RESULTS

##### The hydrophobic C-terminal region of Rot1 spans ER-derived microsomal membranes

We described previously that the Rot1 protein is attached to the ER membrane through a C-terminal hydrophobic domain [13] (Figure 1A). To differentiate between the peripheral and TM association of this protein region, we assayed the membrane insertion capability of this region using an *in vitro* experimental

system based on the inner membrane protein Lep of *E. coli*, which accurately determines the integration of TM helices into ER membranes [16]. Lep consists of two TM segments connected by a cytoplasmic loop (P1) and a large C-terminal domain (P2), and inserts into ER-derived RMs with both termini located in the lumen (Figure 1B). The analysed segment [HR (hydrophobic region)-tested] was engineered into the luminal P2 domain and flanked by two acceptor sites (G1 and G2) for N-linked glycosylation. Both engineered glycosylation sites were used as membrane insertion reporters because G1 will always be glycosylated due to its native luminal localization, but G2 will be glycosylated only upon translocation of the tested region through the microsomal membrane. Therefore single glycosylation (i.e. membrane integration) results in an increase in molecular mass of ~2.5 kDa relative to the observed molecular mass of Lep expressed in the absence of microsomes; the molecular mass shifts 5 kDa upon double glycosylation (i.e. membrane translocation of the HR-tested). PK (proteinase K) added to microsomal vesicles digested the cytoplasm-exposed non-glycosylated form of the P2 domain (Figure 1B, left-hand panel) to produce a protected, double-glycosylated P2 fragment when the P2 domain is located in the lumen of the RMs (Figure 1B, right-hand panel).

The membrane-spanning capacity of any protein region can be predicted using the apparent free energy ( $\Delta G_{app}$ ) for insertion into biological membranes using the  $\Delta G$  Prediction Server v1.0 [17] (<http://dgpred.cbr.su.se/>). Given the amino acid sequence of the Rot1 protein, the algorithm predicted only one TM helix with a computed  $\Delta G_{app}$  value of  $-0.66$  kcal/mol, which is indicative of a membrane-spanning disposition. On the basis of this prediction, residues 237–256 of Rot1 were selected for analysis using Lep chimaera membrane insertion. The translation of this construct mainly resulted in single glycosylated forms (Figure 1C, lane 5). PK treatment of this sample rendered a complete loss of detectable fragments (Figure 1C, lane 6), confirming the TM disposition of the predicted Rot1 sequence. A previously tested control construct [18,19] with a computer-designed non-integration sequence is shown for comparison (Figure 1C, lanes 1–3).

#### The Rot1 TM segment plays an essential role in cell viability

After demonstrating that the Rot1 C-terminal hydrophobic region spans biological membranes, we designed an experimental cell viability approach to study its functional role. To check the functionality of mutated forms of Rot1, we used a conditional mutant strain that expresses the *ROT1* gene under the control of the tetracycline-regulated *tetO<sub>2</sub>* promoter. As expected, the *tetO<sub>2</sub>:ROT1* cells were non-viable in YPD medium containing 10  $\mu$ g/ml doxycycline (one of the tetracycline antibiotics). This lethality was suppressed by the presence of a centromeric plasmid-containing *ROT1* (pROT1) (Figure 2A). Thus the functionality of mutants can be evaluated by their ability to recover cell growth in the presence of doxycycline. Furthermore, in order to detect the Rot1 protein, a triple HA epitope sequence was fused in the middle region of the protein (between amino acids 181 and 182) without perturbing the essential C-terminus domain and with maintenance of the fully functional protein (pROT1-HA) (Figure 2A).

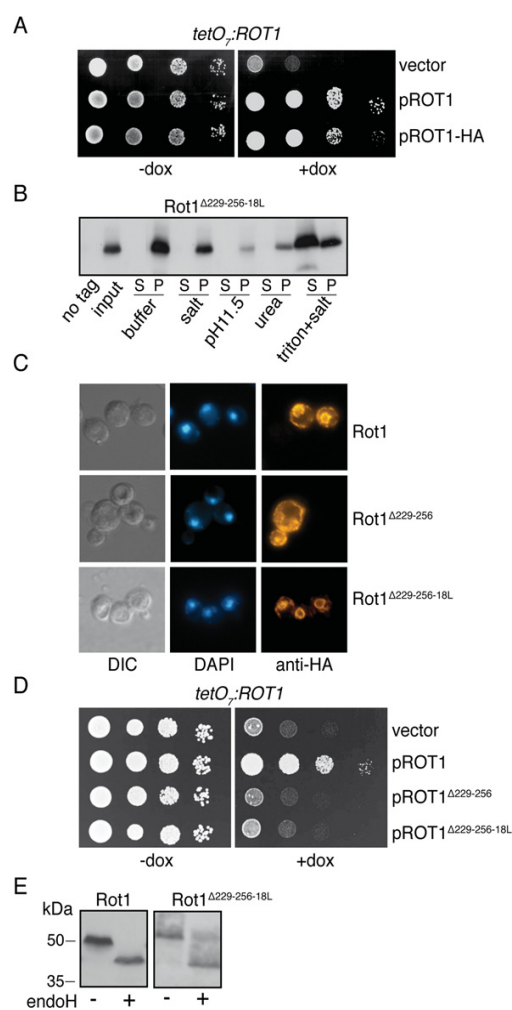
We demonstrated previously that deletion of the C-terminal TM helix of the protein results in cell death [20]. To determine whether the loss of function of the protein lacking the TM segment was due to the mislocation of the protein, to the C-terminus-truncated Rot1 protein (Rot1 <sup>$\Delta$ 229–256</sup>) we fused a poly-leucine stretch (Rot1 <sup>$\Delta$ 229–256–18L</sup>; 18 consecutive leucine residues) that can restore the membrane-insertion capacity through this chimaeric C-terminal domain. We first tested the membrane association

of this chimaera by subcellular fractionation. As shown in Figure 2(B), only the chimaeric protein was extracted from membranes after treatment with detergent and salt, a condition that has been proven to solubilize integral membrane proteins [21]. Immunofluorescence assays of cells expressing Rot1 wild-type or Rot1 <sup>$\Delta$ 229–256–18L</sup> proteins revealed a similar nuclear-peripheral signal (Figure 2C), a pattern reminiscent of nuclear envelope membrane staining, largely different from the diffuse pattern observed for cells expressing Rot1 <sup>$\Delta$ 229–256</sup>. Thus the chimaeric Rot1 <sup>$\Delta$ 229–256–18L</sup> protein localized correctly in yeast cells. However, the protein was not functional because it was unable to suppress the lethality of the *tetO<sub>2</sub>:ROT1* strain in the presence of doxycycline (Figure 2D). The loss of functionality of this Rot1 <sup>$\Delta$ 229–256–18L</sup> protein could have been caused by incorrect positioning of the mutant protein in the ER membrane. The fact that Rot1 is a glycosylated protein at Asn<sup>103</sup>, Asn<sup>107</sup> and Asn<sup>139</sup> [13] is useful for unravelling the correct orientation of the protein. In eukaryotic cells, N-glycosylation occurs only in the lumen of the ER, where the active site of oligosaccharyl transferase is located [22]. The glycosylation status of a protein can be assessed by digesting cell extracts with the glycan-removing enzyme endo H because the glycosylated and non-glycosylated forms are easily detected by their different electrophoretic mobilities. The Rot1 <sup>$\Delta$ 229–256–18L</sup> protein was properly glycosylated (Figure 2E), indicating that the poly-leucine-anchored chimaeric protein was properly inserted and oriented in the cellular endomembrane system, but it was not functional as shown by its incapacity to restore cell viability. Taken together, these results suggest that the TM domain of Rot1 not only anchors the protein to the membrane, but also plays an important role in protein function, probably through its association with other membrane proteins.

#### Scanning analysis of amino acids in the TM domain of Rot1

To rapidly identify the most critical segment of the TM helix of Rot1, we used an insertion scanning mutagenesis approach [23]. The rationale was that insertion of an alanine residue (i.e. a hydrophobic residue with a high helix propensity) into a TM helix will displace the residues on the N-terminal side of the insertion by 100° relative to those on the C-terminal side of the insertion. This turn might effectively disrupt a putative helix–helix packing interface involving residues on both sides of the insertion site. Alternatively, no detrimental effects should be observed if the insertion is outside the critical interface residues. To test the structural consequences of the insertions, six alanine insertions were designed throughout the Rot1 TM helix (Table 1). The ability of the different Rot1 mutant proteins to support growth was tested using the *tetO<sub>2</sub>:ROT1* strain in the presence of doxycycline. Only cells transformed with the plasmid-expressing mutants Rot1<sup>A232</sup> and Rot1<sup>A251</sup> were able to grow, whereas alanine residue insertions inside this region (Rot1<sup>A237</sup>, Rot1<sup>A242</sup>, Rot1<sup>A245</sup> or Rot1<sup>A248</sup>) generated mutants that were unable to grow in the presence of doxycycline (Figure 3A). These results identified the central region of the TM C-terminal domain, between residues 231–251, as a critical region for cell viability.

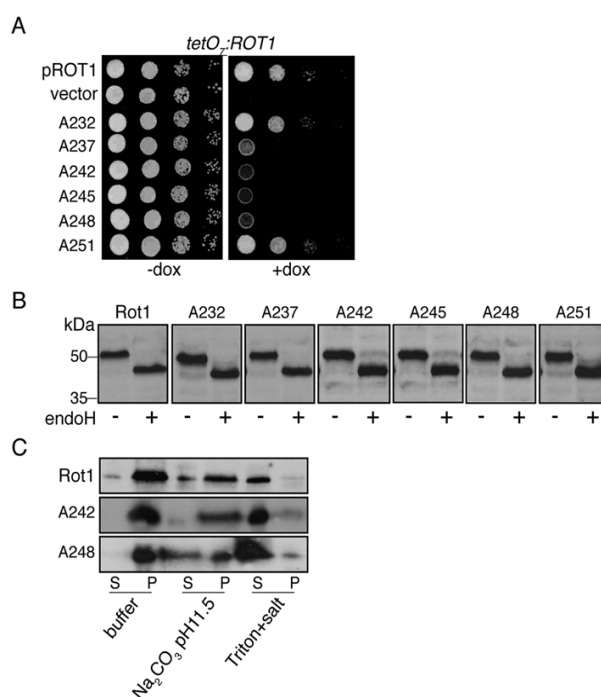
Interestingly, when the extracts of cells expressing different alanine-inserted Rot1 mutants were treated with endo H, a clear shift in electrophoretic mobility was observed in all cases (Figure 3B). These results confirm that the alanine residue insertions did not affect the glycosylation pattern of the protein and, therefore, all Rot1 forms translocated across the yeast ER membrane similar to the native protein. We also tested the association of these mutant proteins with the membrane using subcellular fractionation. All of the alanine-inserted



**Figure 2 Essential role of the Rot1 TM domain in cell viability**

(A) Serial dilutions (10-fold) from exponentially growing cultures of the *tetO<sub>2</sub>::ROT1* strain (JCY216) transformed with an empty vector, a centromeric plasmid bearing *ROT1* or *ROT1-HA* were spotted on to YPD medium plates with or without 10  $\mu$ g/ml doxycycline (dox) and incubated at 28 °C for 3 days. (B) Extracts from exponentially growing cultures of the wild-type strain (CML240) transformed with the HA-tagged Rot1<sup>Δ229-256-18L</sup> plasmid were treated with buffer containing 0.5 M NaCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.5), 2.5 M urea or 1 % Triton X-100 plus 0.5 M NaCl and divided into pellet (P) and supernatant (S) fractions by high-speed centrifugation. An extract from the wild-type strain (CML240) was included as a control (no tag). The proteins were examined by Western blot analysis. (C) Cells from exponentially growing cultures of the wild-type strain (CML240) transformed with a plasmid expressing the HA-tagged version of Rot1, Rot1<sup>Δ229-256</sup> and Rot1<sup>Δ229-256-18L</sup> were assayed by indirect immunofluorescence. Differential interference contrast (DIC) images, Rot1-HA indirect-fluorescence signals (anti-HA) and DAPI staining of DNA are shown. No signal was detected with the untagged wild-type strain (results not shown). (D) Serial dilutions (10-fold) from exponentially growing cultures of the *tetO<sub>2</sub>::ROT1* strain (JCY216) transformed with an empty vector, a centromeric plasmid bearing *ROT1*, *ROT1*<sup>Δ229-256</sup> or *ROT1*<sup>Δ229-256-18L</sup> were spotted on to YPD medium plates with or without 10  $\mu$ g/ml doxycycline (dox) and incubated at 28 °C for 3 days. (E) Extracts from exponentially growing cultures of the wild-type strain (CML240) containing the pRot1 or pRot1<sup>Δ229-256-18L</sup> plasmids were mock treated or digested with 50 milliunits of endo H.





**Figure 3** Identification of the essential region within the TM domain of Rot1

(A) Serial dilutions (10-fold) from exponentially growing cultures of the *tetO<sub>2</sub>;*ROT1 strain (JCY216) transformed with a centromeric plasmid bearing ROT1, an empty vector or ROT1 expressing alanine at different positions (A232, A237, A242, A245, A248 and A251) were spotted on to YPD medium plates with or without 10  $\mu$ g/ml doxycycline (dox) and incubated at 28 °C for 3 days. (B) Extracts from exponentially growing cells containing the same plasmids as above were mock treated or digested with 50 milliunits of endo H. The proteins were analysed by Western blot. (C) Extracts from exponentially growing cultures of the wild-type strain transformed with the pROT1, pROT1<sup>A242</sup> and pROT1<sup>A248</sup> plasmids were treated with buffer, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.5) or 1% Triton X-100 plus 0.5 M NaCl and divided into pellet (P) and supernatant (S) fractions by high-speed centrifugation.

**Table 1** Alanine insertion mutations of the TM domain of Rot1

The inserted alanine residues are shown in bold.

Plasmid	TM sequence (residues 229–256)
pROT1	NTS FLTSNAI WYISAGM LGVGSL FLAF
A232	NTS <b>A</b> FLTSNA IWYISAG MLGVGSL LFLAF
A237	NTS FLTSNA <b>A</b> IWYISAG MLGVGSL LFLAF
A242	NTS FLTSNAI WY <b>I</b> ASAG MLGVGSL LFLAF
A245	NTS FLTSNAI WYISAG <b>A</b> MLGVGSL LFLAF
A248	NTS FLTSNAI WYISAGM LG <b>A</b> VGSL LFLAF
A251	NTS FLTSNAI WYISAGM LGVGS <b>A</b> L LFLAF

Rot1 mutants were recovered in the soluble fraction after incubation with detergent plus salt, which, as mentioned above, is a common feature for integral membrane proteins although some proteins also partially solubilized with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.5) treatment (Figure 3C and Supplementary Figure S1 at <http://www.biochemj.org/bj/458/bj4580239add.htm>). These results indicate that all of the tested forms of the protein

translocated correctly their large N-terminal region and inserted the hydrophobic C-terminal domain into the ER membrane. Therefore loss of viability in these alanine-inserted Rot1 mutants was not due to reverse orientation or mislocalization of the proteins. In conclusion, the results of the present study indicate that the region between residues 231–251 plays an essential role in cell viability, and clearly shows that the integrity of this domain is required for proper protein function.

#### Transmembrane Ser<sup>250</sup> of Rot1 is a critical residue for protein function

Next, we further analysed the 231–251 region using a more focused saturation mutagenesis strategy. Within the past two decades, interactions between TM helices have been found to be based on different types of physical forces and to involve different amino acid types [24]. Non-hydrophobic residues are involved in membrane protein stability and packing [25]. Because replacement of the native TM segment by a poly-leucine TM region did not restore cell viability, all of the non-hydrophobic residues

in this region were independently mutated to leucine residues. Leucine is a highly hydrophobic residue, is the most prevalent residue in TM helices [7] and contributes significantly to TM helix stability.

The mutated Rot1 proteins (Table 2) were expressed in a centromeric plasmid, and its capacity to suppress the lethality of the *tetO<sub>2</sub>-ROT1* strain in the presence of doxycycline was investigated. The ability of cells expressing the mutant proteins shown in Table 2 to support growth are shown in Figure 4(A). Almost all of the point mutant protein forms were able to maintain cell viability, indicating that these residues were not essential for protein functionality and/or helix association (Figure 4A). However, cells expressing Rot1 protein mutated at Ser<sup>250</sup> (Rot1<sup>S250L</sup>) were clearly not viable in the presence of doxycycline. To rule out the possibility that this mutant protein was not properly expressed in yeast cells, we analysed the glycosylation status of the Rot1<sup>S250L</sup> mutant using endo H treatment and its association with the ER membrane using immunofluorescence assays (Figures 4B and 4C). No differences were found when comparing the wild-type protein and Rot1<sup>S250L</sup>. These results suggest strongly that Ser<sup>250</sup> in the TM domain is not required for proper protein localization and orientation within the membrane, but that it is essential for protein function and cell viability.

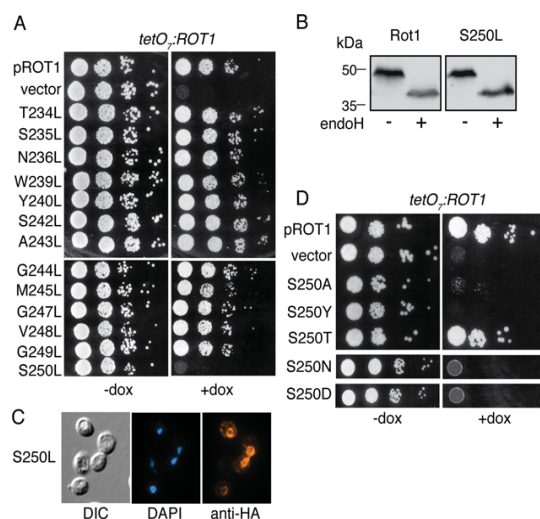
To explore further the relevance of this single serine residue, we replaced Ser<sup>250</sup> with other amino acid residues covering a broad range of side chain chemical groups, and confirmed the expression of all protein mutants in cell cultures

**Table 2** Leucine residue mutations of the TM domain of Rot1

The residues mutated to leucine are shown in bold.

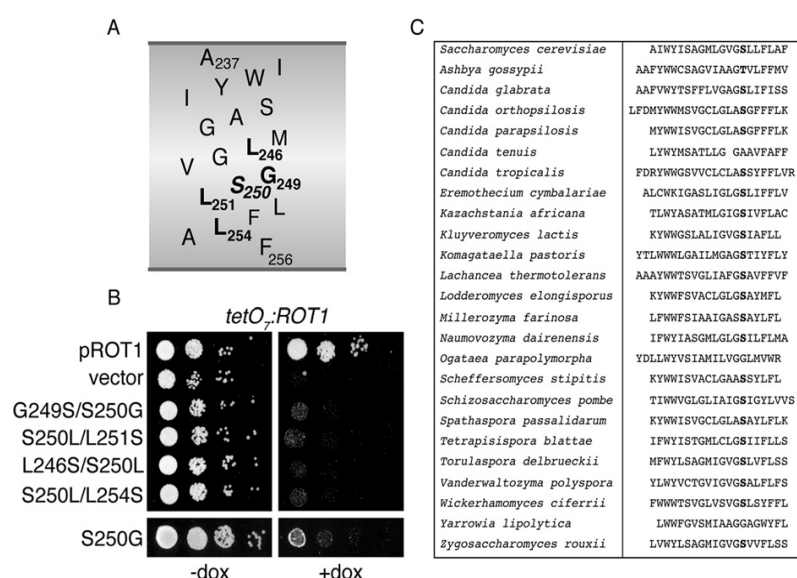
Plasmid	TM sequence (residues 232–252)		
pROT1	FLTSNAI	WYISAGM	LGVGSL
T234L	<b>F</b> LLSNAI	WYISAGM	LGVGSL
S235L	FL <b>T</b> LNAI	WYISAGM	LGVGSL
N236L	FL <b>T</b> SLAI	WYISAGM	LGVGSL
W239L	FLTSNAI	<b>L</b> YISAGM	LGVGSL
Y240L	FLTSNAI	WLISAGM	LGVGSL
S242L	FLTSNAI	WY <b>L</b> LAGM	LGVGSL
A243L	FLTSNAI	WYIS <b>L</b> GM	LGVGSL
G244L	FLTSNAI	WYIS <b>A</b> LM	LGVGSL
M245L	FLTSNAI	WYIS <b>A</b> GL	LGVGSL
G247L	FLTSNAI	WYISAG <b>M</b>	LLVGSL
V248L	FLTSNAI	WYISAG <b>M</b>	LG <b>L</b> GSLL
G249L	FLTSNAI	WYISAG <b>M</b>	LG <b>V</b> LSLL
S250L	FLTSNAI	WYISAG <b>M</b>	LG <b>V</b> GLLL

(Supplementary Figure S2, upper panel at <http://www.biochemj.org/bj/458/bj4580239add.htm>). First, Ser<sup>250</sup> was substituted with alanine in order to rule out the possibility that the loss of function was caused by the bulky leucine side chain. The Rot1<sup>S250A</sup> mutant was unable to support cell viability (Figure 4D), confirming the importance of the serine residue for Rot1 functionality.



**Figure 4** Amino acid analysis of the TM domain of Rot1

(A) Serial dilutions (10-fold) from exponentially growing cultures of the *tetO<sub>2</sub>-ROT1* strain (JCY216) transformed with a centromeric plasmid bearing *ROT1*, an empty vector or point mutants of *ROT1* were spotted on to YPD medium plates with or without 10  $\mu$ g/ml doxycycline (dox) and incubated at 28 °C for 3 days. (B) Extracts from exponentially growing cultures containing the pRot1 or pRot1<sup>S250A</sup> plasmids were mock treated or digested with 50 milliunits of endo H. (C) Cells from exponentially growing cultures of the wild-type strain (CML240) transformed with pRot1<sup>S250A</sup> plasmids expressing the HA-tagged version of Rot1<sup>S250L</sup> were assayed by indirect immunofluorescence. Differential interference contrast (DIC) images, Rot1-HA indirect fluorescence signals (anti-HA) and DAPI staining of DNA are shown. (D) Serial dilutions (10-fold) from exponentially growing cultures of the *tetO<sub>2</sub>-ROT1* strain (JCY216) transformed with a centromeric plasmid bearing *ROT1*, an empty vector, and plasmids bearing ROT1<sup>S250A</sup>, ROT1<sup>S250Y</sup>, ROT1<sup>S250T</sup>, ROT1<sup>S250N</sup> and ROT1<sup>S250D</sup> were spotted on to YPD medium plates with or without 10  $\mu$ g/ml doxycycline (dox) and incubated at 28 °C for 3 days.



**Figure 5** Analysis of the Ser<sup>250</sup> position in the TM domain and its conservation among yeast strains

(A) Ser<sup>250</sup> and the mutated residues in the Rot1 TM helix mapped on to a helical net diagram. The essential Ser<sup>250</sup> is shown in italic and the mutated residues are in bold. (B) Serial dilutions (10-fold) from exponentially growing cultures of the *tetO<sub>2</sub>-ROT1* strain (JCY216) transformed with a plasmid bearing *ROT1*, an empty vector, and plasmids bearing *ROT1*<sup>G249S/S250G</sup>, *ROT1*<sup>S250L/L251S</sup>, *ROT1*<sup>L246S/S250L</sup>, *ROT1*<sup>S250L/L254S</sup> and *ROT1*<sup>S250G</sup> were spotted on to YPD medium plates with or without 10 μg/ml doxycycline (dox) and incubated at 28 °C for 3 days. (C) Sequence analysis of 25 different yeast Rot1 proteins. Ser<sup>250</sup> is shown in bold.

Residues containing hydroxy groups with strong hydrogen-bonding potential significantly change the local helical structure [26]. In order to determine whether the essential role of the TM Ser<sup>250</sup> is due to its polar hydroxy group, we analysed the effect of replacing Ser<sup>250</sup> with a hydroxylated side chain residue, threonine or tyrosine. S250Y was not able to support the growth of the *tetO<sub>2</sub>-ROT1* strain in the presence of doxycycline. In contrast, cells expressing the Rot1<sup>S250T</sup> mutant protein grew similarly to cells expressing the wild-type protein (Figure 4D), indicating that Rot1<sup>S250T</sup> is a functional protein. This finding demonstrates clearly that a side chain containing a hydroxy group is required for protein function, but this function can be prevented in the case of a bulkier side chain, as demonstrated for the S250Y mutant. Several studies have demonstrated a substantial contribution of hydrogen bonds formed by asparagine residues [3,8,27–29] and counter-charge aspartic acid residues [30] on the packing of TM helices. Therefore the replacement of Ser<sup>250</sup> with asparagine (S250N) or aspartic acid (S250D) residues was investigated. As shown in Figure 4(D), neither S250N nor the S250D mutant restored cell viability, highlighting the relevance of the unique serine residue. As the S250D mutant was not viable, a negative charge, such as potential phosphorylation of the serine residue, was deemed as not essential for Rot1 function.

Next, we tested whether the hydroxy group has to be placed at a particular position within the TM helix. In order to test whether the position of Ser<sup>250</sup> is critical for cell viability without altering the amino acid composition of the TM segment, double mutants

were designed to locate the serine residue one position upstream (pROT1<sup>G249S/S250G</sup>) or downstream (pROT1<sup>S250L/L251S</sup>) of its usual position (Figure 5A). As shown in Figure 5(B), swapping Ser<sup>250</sup> with one of its adjacent residues (Gly<sup>249</sup> or Leu<sup>251</sup>) precludes cell survival. Next, we tested whether locating the critical serine residue just one helix turn upwards or downwards could rescue Rot1 function. Mutants swapping the leucine residues at positions 246 and 254 with Ser<sup>250</sup> (Figure 5A) were designed, and none of these mutants recovered cell viability (Figure 5B). As before, double-mutant protein expressions were confirmed by Western blotting (Supplementary Figure S2, lower panel). Taken together, these results suggest that a precise geometric arrangement of the serine side chain in terms of azimuthal rotation (G249S/S250G and S250L/L251S) and depth of insertion (L246S/S250L and S250L/L254S) into the hydrophobic core of the membrane (Figure 5A) is required for cell viability. Therefore the serine residue hydroxy group must be placed at position 250 to achieve a functional protein in living cells.

#### The Rot1 TM segment does not homo-oligomerize in biological membranes

Integral membrane proteins are often organized into functional complexes and form homo- and/or hetero-oligomeric assemblies. To assess the propensity of the TM segment of Rot1 to homo-oligomerize in biological membranes, residues 237–256

were inserted into the ToxR–Rot1 TM–MBP chimaeric protein for use in the ToxCAT assay (Supplementary Figure S3 at <http://www.biochemj.org/bj/458/bj4580239add.htm>). In this assay [15,31], if the TM segment in the chimaeric protein drives homo-oligomerization in the inner membrane of *E. coli*, the ToxR domain is brought into close proximity with another ToxR domain, activating the transcription of a reporter gene encoding CAT. Thus the level of CAT expression in the cell can be used as an indicator of the extent of TM segment-mediated homo-oligomerization in the membrane [15]. The malE complementation test showed that the chimaeric construct was inserted correctly into the inner membrane of *E. coli* strain NT326 and had the expected membrane topology (Supplementary Figure S3B). Western blotting of the *E. coli* cell lysates showed that the expression level of the Rot1-derived chimaeric protein was comparable with that of wild-type GpA and GpA G83I mutant, the well-documented control constructs for highly homo-oligomerizing and monomeric TM segments respectively [4,15]. However, the Rot1 TM construct did not induce significant CAT expression, indicating that the Rot1 TM domain does not homo-oligomerize in biological membranes (Supplementary Figure S3C).

## DISCUSSION

Most studies that have characterized and analysed TM domains have been performed *in vitro* using artificial membranes with synthetic peptides. However, the environment in which a TM segment is studied can be critical and the detergent used to generate artificial membranes can significantly influence the arrangements of the TM helix, especially when this domain contains polar residues [32]. The paucity of data obtained from *in vivo* approaches led us to investigate the role of the C-terminal hydrophobic region of the Rot1 protein. Rot1 is an essential yeast protein implicated in diverse processes, such as actin cytoskeleton dynamics, cell wall biosynthesis and molecular chaperoning. The Rot1 C-terminal domain provides an attractive model for testing whether this hydrophobic region functions as a mere membrane anchoring sequence or whether specific residues play a precise role in eukaryotic cells. An intrinsic advantage of using an essential protein is that the relevance of individual residues in protein function can be analysed in cell viability tests.

First, we demonstrated that the C-terminal hydrophobic region spans biological membranes and that this region is important for protein function. When the complete TM segment was substituted with a poly-leucine stretch (18 consecutive leucine residues), no effect was observed on protein location, but cell viability was severely compromised. However, alanine insertion scanning and single leucine substitutions of most of the residues had no effect on protein function or cell growth. Only some mutations within the TM segment were found to be essential for cell survival, and the results of the present study identified a unique serine residue within the TM domain, Ser<sup>250</sup>, which appears to be critical for protein functionality. These results suggest that Ser<sup>250</sup> may participate in homomeric and/or heteromeric interactions with other membrane components. Interestingly, Ser<sup>250</sup> can be replaced by threonine (S250T mutant) without affecting protein function. This result strongly indicates that the hydroxy group present in serine and threonine is essential for a functional protein, probably by promoting TM helix association through polar interactions between similar residues or between these residues and backbone oxygens. The S250Y mutants were not viable, probably because

the bulkier side chain of tyrosine precludes appropriate helix packing.

In principle, hydrogen-bonding interactions can be relevant at any position along the TM region. However, in the case of Rot1, the precise location of Ser<sup>250</sup> in the helix is crucial. Relocating Ser<sup>250</sup> one residue or one helix turn upstream or downstream compromised cell viability. In addition, mutation of the other serine residue present in the TM segment, Ser<sup>242</sup>, to leucine turned out to be irrelevant to protein function. These results indicate that an important hydrogen bond must be formed at the C-terminal portion of the helix in a particular position and/or orientation.

A single serine–serine interaction has been suggested to not provide a sufficient driving force for TM peptide association [9]. In a model peptide that is entirely hydrophobic throughout a 20-residue segment containing a single central site for the introduction of various amino acid 'guests', asparagine, glutamine, aspartic acid and glutamic acid formed stable trimers in micelles; however, serine and threonine failed to direct trimer formation [5], indicating that the hydroxy group of serine plays a relatively modest role in stabilizing peptide association compared with other polar residues, such as asparagine and glutamine [3,5,6,33]. Instead, the interaction between multiple serine residues allows the formation of a 'serine zipper', which is postulated to promote TM helix association [9,10]. Thus first we studied the importance of Asn<sup>236</sup> within the TM domain of Rot1, and secondly whether Ser<sup>250</sup> function can be replaced by asparagine. The results with N236L and S250N showed clearly that the polar asparagine residue side chain is not involved in Rot1 TM function.

The essential role for the Rot1 TM segment beyond its anchoring function suggests that the protein must associate with other membrane components to exert its function. Notably, global studies using massive analysis techniques have not been able to identify any Rot1-associated protein in crude yeast extracts [34,35]. In a recent interaction landscape study specific for membrane protein complexes in *S. cerevisiae* no protein interaction was identified for Rot1 [36], probably due to the harsh extraction conditions that could disrupt the association of Rot1 with other proteins. ToxCAT studies indicated the absence of TM-driven homo-oligomerization in cell membranes (Supplementary Figure S3). We also studied other proteins that are known to interact with Rot1, such as the protein chaperone Kar2 (karyogamy 2) [37] and a component of the post-translational translocation complex Sec62 (secretory 62) [13] (Supplementary Figure S4 at <http://www.biochemj.org/bj/458/bj4580239add.htm>). In both cases, we did not find significant differences in the protein interactions between wild-type Rot1 and the Rot1<sup>S250L</sup> mutant using co-immunoprecipitation analysis.

The relevance of TM serine residues to protein function has been studied previously in other proteins. The mutation of some serine residues within the predicted TM helix 17 of MRP3 (multidrug-resistance protein 3) determined changes in substrate specificity [38]. Replacing Ser<sup>319</sup> of TM helix H7 of hamster  $\beta_2$ -adrenergic receptor can influence receptor expression and function [39]. In addition, substitution of Ser<sup>161</sup> and Ser<sup>165</sup> in TM helix H4 decreased the expression and activity of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor, but did not affect specific binding to the antagonist ligand [40]. As far as we know, the present study of the Rot1 protein is the first time in which a single polar amino acid in a TM segment has been shown to be essential for cell viability. Rot1 is a conserved protein in yeast, although its function has only been studied in *S. cerevisiae*. Comparative analysis of the TM sequence showed that Ser<sup>250</sup> is conserved in 21 of the 25

species compared (one substituted by threonine) (Figure 5C). In this sequence alignment, we observed two organisms that replaced Ser<sup>250</sup> with glycine and in *Candida tenuis* Ser<sup>250</sup> was replaced with alanine. Since substitution with alanine (S250A) has been proven to preclude cell growth, we further replaced Ser<sup>250</sup> with glycine in the *S. cerevisiae* Rot1 protein. We performed the required amino acid change, S250G, but this mutant was not viable (Figure 5B). Therefore the function of Ser<sup>250</sup> seems to be highly conserved among yeast.

To summarize, we used an *in vivo* system to describe how a unique hydroxy-containing residue inside a TM domain is essential for maintaining protein function and/or protein association. These findings add force to the emerging picture of the role of polar groups in membrane protein folding. Although interactions with other parts of the molecule cannot be discarded, on the basis of our biochemical and cell viability results, Ser<sup>250</sup> might be involved in hetero-oligomeric interactions. Further studies are necessary to ascertain the specific role for Ser<sup>250</sup> in these interactions and its partners within the cell membrane, and to investigate whether single serine residue-based motifs may provide a novel mechanism for membrane protein association/function.

#### AUTHOR CONTRIBUTION

J. Carlos Igual, Ismael Mingarro and M. Carmen Bañó developed the original concept. All authors conceived and designed the experiments. Carlos Martínez-Garay performed the experiments. Carlos Martínez-Garay, J. Carlos Igual, Ismael Mingarro and M. Carmen Bañó analysed the data. Ismael Mingarro and M. Carmen Bañó wrote the paper. Carlos Martínez-Garay, M. Angeles Juanes and J. Carlos Igual proofread drafts of the paper before submission.

#### ACKNOWLEDGEMENT

We thank Professor D. M. Engelman for the ToxCAT vectors and *E. coli* NT326 cells.

#### FUNDING

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish Government (co-financed by European Regional Development Fund of the European Union) [grant numbers BFU2010-20927 and BFU2012-39482] and Generalitat Valenciana [grant numbers ACOMP/2012/219, GVACOMP/2013-175, PROMETEO/2010/005 and ISIC/2013/004].

#### REFERENCES

- Wallin, E. and von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* **7**, 1029–1038
- Cymer, F. and Schneider, D. (2012) Oligomerization of polytopic  $\alpha$ -helical membrane proteins: causes and consequences. *Biol. Chem.* **393**, 1215–1230
- Zhou, F. X., Cocco, M. J., Russ, W. P., Brunger, A. T. and Engelman, D. M. (2000) Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 154–160
- Bañó-Polo, M., Baeza-Delgado, C., Orzáez, M., Martí-Renom, M. A., Abad, C. and Mingarro, I. (2012) Polar/ionizable residues in transmembrane segments: effects on helix-helix packing. *PLoS ONE* **7**, e44263
- Gratkowski, H., Lear, J. D. and DeGrado, W. F. (2001) Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 880–885
- Senes, A., Engel, D. E. and DeGrado, W. F. (2004) Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 465–479
- Baeza-Delgado, C., Martí-Renom, M. A. and Mingarro, I. (2013) Structure-based statistical analysis of transmembrane helices. *Eur. Biophys. J.* **42**, 199–207
- Zhou, F. X., Merianos, H. J., Brunger, A. T. and Engelman, D. M. (2001) Polar residues drive association of poly-leucine transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 2250–2255
- Dawson, J. P., Weinger, J. S. and Engelman, D. M. (2002) Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices. *J. Mol. Biol.* **316**, 799–805
- North, B., Cristian, L., Fu Stowell, X., Lear, J. D., Saven, J. G. and DeGrado, W. F. (2006) Characterization of a membrane protein folding motif, the Ser zipper, using designed peptides. *J. Mol. Biol.* **359**, 930–939

- Val, C., White, S. H. and Bondar, A.-N. (2012) Ser/Thr motifs in transmembrane proteins: conservation patterns and effects on local protein structure and dynamics. *J. Membr. Biol.* **245**, 717–730
- Juanes, M. A., Queralt, E., Bano, M. C. and Igual, J. C. (2007) Rot1 plays an antagonistic role to Ctb2 in actin cytoskeleton dynamics throughout the cell cycle. *J. Cell Sci.* **120**, 2390–2401
- Juanes, M. A., Igual, J. C. and Bañó, M. C. (2008) Membrane topology and post-translational modification of the *Saccharomyces cerevisiae* essential protein Rot1. *Yeast* **25**, 93–106
- Belli, G., Gari, E., Aldea, M. and Herrero, E. (1998) Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* **14**, 1127–1138
- Russ, W. P. and Engelman, D. M. (1999) TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 863–868
- Hessa, T., Kim, H., Bihmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S. H. and von Heijne, G. (2005) Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* **433**, 377–381
- Hessa, T., Meindl-Beinker, N. M., Bernsel, A., Kim, H., Sato, Y., Lerch-Bader, M., Nilsson, I., White, S. H. and von Heijne, G. (2007) Molecular code for transmembrane-helix recognition by the SecE1 translocon. *Nature* **450**, 1026–1030
- Martinez-Gil, L., Sauri, A., Vilar, M., Pallás, V. and Mingarro, I. (2007) Membrane insertion and topology of the p7B movement protein of Melon Necrotic Spot Virus (MNSV). *Virology* **367**, 348–357
- Saal, A., Wallin, E. and von Heijne, G. (1998) Stop-transfer function of pseudo-random amino acid segments during translocation across prokaryotic and eukaryotic membranes. *Eur. J. Biochem.* **251**, 821–829
- Juanes, M. A., Martínez-Garay, C. A., Igual, J. C. and Bañó, M. C. (2010) Targeting and membrane insertion into the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae* essential protein Rot1. *FEMS Yeast Res.* **10**, 639–647
- Swanson, R., Locher, M. and Hochstrasser, M. (2001) A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and *Matu2* repressor degradation. *Genes Dev.* **15**, 2660–2674
- Martinez-Gil, L., Sauri, A., Martí-Renom, M. A. and Mingarro, I. (2011) Membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *FEBS J.* **278**, 3846–3858
- Mingarro, I., Whitley, P., Lemmon, M. A. and von Heijne, G. (1996) Ala-insertion scanning mutagenesis of the glycoporphin A transmembrane helix: a rapid way to map helix-helix interactions in integral membrane proteins. *Protein Sci.* **5**, 1339–1341
- Langosch, D. and Arkin, I. T. (2009) Interaction and conformational dynamics of membrane-spanning protein helices. *Protein Sci.* **18**, 1343–1358
- Bowie, J. U. (2005) Solving the membrane protein folding problem. *Nature* **438**, 581–589
- Deupi, X., Olivella, M., Sanz, A., Dölker, N., Campillo, M. and Pardo, L. (2010) Influence of the  $\gamma$ -conformation of Ser and Thr on the structure of transmembrane helices. *J. Struct. Biol.* **169**, 116–123
- Ruan, W., Lindner, E. and Langosch, D. (2004) The interface of a membrane-spanning leucine zipper mapped by asparagine-scanning mutagenesis. *Protein Sci.* **13**, 555–559
- Lear, J. D., Gratkowski, H., Adamian, L., Liang, J. and DeGrado, W. F. (2003) Position-dependence of stabilizing polar interactions of asparagine in transmembrane helical bundles. *Biochemistry* **42**, 6400–6407
- Choma, C., Gratkowski, H., Lear, J. D. and DeGrado, W. F. (2000) Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 161–166
- Bañó-Polo, M., Martínez-Gil, L., Wallner, B., Nieva, J. L., Eklöfsson, A. and Mingarro, I. (2013) Charge pair interactions in transmembrane helices and turn propensity of the connecting sequence promote helical hairpin insertion. *J. Mol. Biol.* **425**, 830–840
- Langosch, D., Brosig, B., Kolmar, H. and Fritz, H.-J. (1996) Dimerisation of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J. Mol. Biol.* **263**, 525–530
- Prodhö, A., Weber, M., Dreher, C. and Schneider, D. (2007) A mutational study of transmembrane helix-helix interactions. *Biochimie* **89**, 1433–1437
- DeGrado, W. F. (2003) How do helix-helix interactions help determine the folds of membrane proteins? Perspectives from the study of homo-oligomeric helical bundles. *Protein Sci.* **12**, 647–665
- Gavin, A.-C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A.-M. and Cruciat, C.-M. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141–147
- Miller, J. P., Lo, R. S., Ben-Hur, A., Desmarais, C., Stagjar, I., Noble, W. S. and Fields, S. (2005) Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 12123–12128
- Babu, M., Vlasblom, J., Pu, S., Guo, X., Graham, C., Bean, B. D. M., Burston, H. E., Vizecoumar, F. J., Snider, J., Phanse, S. et al. (2012) Interaction landscape of membrane-protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **489**, 1–6

- 37 Takeuchi, M., Kimata, Y. and Kohno, K. (2008) *Saccharomyces cerevisiae* Rot1 is an essential molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3514–3525
- 38 Zhang, D.-W., Gu, H.-M., Vasa, M., Muredda, M., Cole, S. P. C. and Deeley, R. G. (2003) Characterization of the role of polar amino acid residues within predicted transmembrane helix 17 in determining the substrate specificity of multidrug resistance protein 3. *Biochemistry* **42**, 9989–10000
- 39 Arakawa, M., Chakraborty, R., Upadhyaya, J., Eilers, M., Reeves, P. J., Smith, S. O. and Chelikani, P. (2011) Structural and functional roles of small group-conserved amino acids present on helix-H7 in the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 1170–1178
- 40 Chelikani, P., Hornak, V., Eilers, M., Reeves, P. J., Smith, S. O., RajBhandary, U. L. and Khorana, H. G. (2007) Role of group-conserved residues in the helical core of  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 7027–7032

---

Received 2 October 2013/21 November 2013; accepted 5 December 2013  
Published as BJ Immediate Publication 5 December 2013, doi:10.1042/BJ20131306



## SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

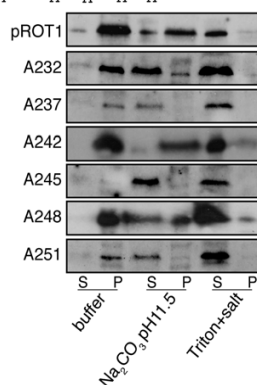
## A transmembrane serine residue in the Rot1 protein is essential for yeast cell viability

Carlos A. MARTÍNEZ-GARAY<sup>1</sup>, M. Angeles JUANES<sup>1</sup>, J. Carlos IGUAL<sup>1</sup>, Ismael MINGARRO<sup>2</sup> and M. Carmen BAÑÓ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València, Burjassot, Spain

MWSKKFTLKKLILGGYLFAQKVYCEDESNSIYGTWSSKSNQVFTGPGFYDPVDELL  
 IEPSTLPLSYSTEDGWYEEATYQVSGNPRNPTCPMASLIYQHGTYNISENGTLVL  
 NPIEVDGRQLFSDPCNDDGVSTYSRYNQTFEYAVGIDPYHGIYTLQLYQYDGT  
 PMQPLYLAYRPPMMLPTELTNPTSSATSTDDPSSNKKRSLRSLVRRSLENRHKTN  
 IKRQNTSFLTSNAIWI**SAGMLGVGSLFLFAP**

↑ A<sup>232</sup>    ↑ A<sup>237</sup>    ↑ A<sup>242</sup>    ↑ A<sup>245</sup>    ↑ A<sup>248</sup>    ↑ A<sup>251</sup>



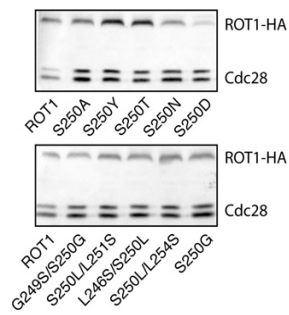
**Figure S1 Association of alanine-inserted Rot1 mutants with the membranes**

Extracts from exponentially growing cultures of the wild-type strain transformed with pRot1, pRot1<sup>A232</sup>, pRot1<sup>A237</sup>, pRot1<sup>A242</sup>, pRot1<sup>A245</sup>, pRot1<sup>A248</sup> and pRot1<sup>A251</sup> plasmids were treated with buffer, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.5) or 1% Triton X-100 plus 0.5 M NaCl and divided into pellet (P) and supernatant (S) fractions by high-speed centrifugation.

<sup>1</sup> Present address: Centre de Recherche en Biochimie Macromoléculaire, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier, France.

<sup>2</sup> Correspondence may be addressed to either of these authors (ismael.mingarro@uv.es or m.carmen.bano@uv.es).

C. A. Martínez-Garay and others

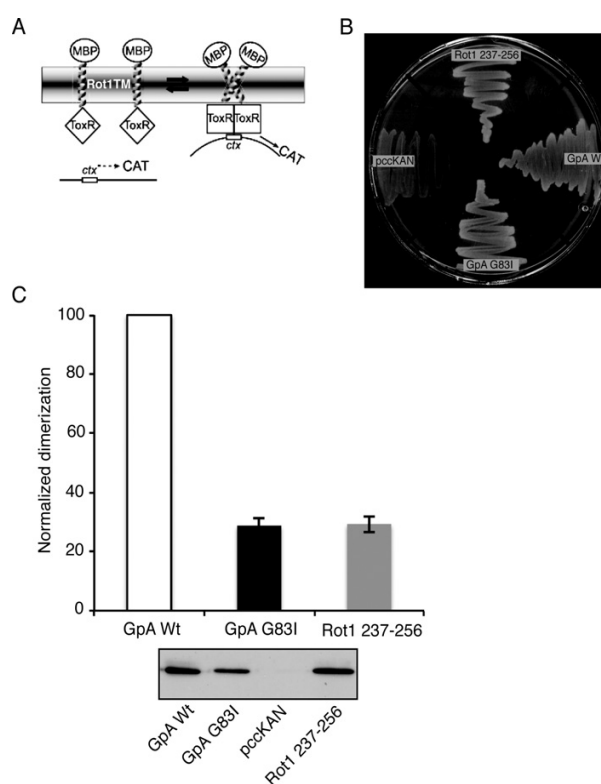


**Figure S2 Protein expression of different Rot1 mutants**

Extracts from exponentially growing cultures of the wild-type strain transformed with plasmids expressing the HA-tagged versions of Rot1, Rot1<sup>S250A</sup>, Rot1<sup>S250Y</sup>, Rot1<sup>S250T</sup>, Rot1<sup>S250N</sup>, Rot1<sup>S250D</sup>, Rot1<sup>G249S/S250G</sup>, Rot1<sup>S250L/L251S</sup>, Rot1<sup>L246S/S250L</sup>, Rot1<sup>S250L/L254S</sup> and Rot1<sup>S250G</sup> were analysed by Western blotting with the anti-HA antibody. Cdc28 (cell division cycle 28) protein was used as a loading control.



A TM serine residue is essential for yeast cell viability



**Figure S3 Dimerization of the Rot1 TM domain in *E. coli* membranes**

(A) Schematic diagram of the ToxCAT assay in which the ToxR domains activate transcription of the *CAT* reporter gene through TM domain-driven dimerization. The MBP domain directs the insertion of the construct into the membrane, complementing the *malE* mutation in the host cells. (B) NT326 cells (*malE* deficient) transformed with plasmids carrying the TM domain derivatives of *ROT1* and *GpA* (dimerizing control), a disruptive *GpA* mutant (G83I), and an empty vector, all of them fused to the ToxR transcription activator and to MBP, were incubated on a plate with 0.4% maltose as the carbon source and incubated at 37 °C for 3 days. (C) Normalized dimerization of the TM domain variants was measured by CAT-ELISA relative to the *GpA* TM domain. Results are means  $\pm$  S.D. for four independent experiments. Levels of selected constructs as analysed by Western blot are shown at the bottom.

C. A. Martínez-Garay and others

**Figure S4 Physical interaction of the Rot1 and Sec62 proteins**

CYC211 cells (*Mata trp1 leu2 his3 ura3 SEC62-FLAG-Kan*) expressing a FLAG-tagged form of *SEC62* transformed with the *pGAL1:ROT1-HA* or *pGAL1:ROT1<sup>S250L</sup>-HA* plasmids, expressing a HA-tagged version of ROT1 or ROT1<sup>S250L</sup> under the control of the *GAL1* promoter, were grown on synthetic medium plus 2% galactose overnight. Rot1 or Rot1<sup>S250L</sup> proteins were immunoprecipitated with an anti-HA antibody from cell crude extracts. The presence of FLAG-tagged Sec62 in the input (I), non-retained (NR) and immunoprecipitate (IP) fractions was determined by Western blot analysis with a specific anti-FLAG antibody.

Received 2 October 2013/21 November 2013; accepted 5 December 2013  
Published as BJ Immediate Publication 5 December 2013; doi:10.1042/BJ20131306



## RESEARCH ARTICLE

## Targeting and membrane insertion into the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae* essential protein Rot1

María Angeles Juanes, Carlos Andrés Martínez-Garay, Juan Carlos Iguar & María Carmen Bañó

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València, València, Spain

**Correspondence:** María Carmen Bañó,  
Departament de Bioquímica i Biologia  
Molecular, Universitat de València, Doctor  
Moliner 50, 46100-Burjassot, València, Spain.  
Tel.: +34 96 3543011; fax: +34 96 3544635;  
e-mail: bano@uv.es

**Present address:** María Angeles Juanes,  
Department of Genetics, University of  
Cambridge, Downing Street, CB2 3EH  
Cambridge, UK.

Received 11 December 2009; revised 20 May  
2010; accepted 27 May 2010.  
Final version published online 30 June 2010.

DOI:10.1111/j.1567-1364.2010.00653.x

Editor: David Goldfarb

### Keywords

Rot1; subcellular localization; membrane  
protein translocation.

### Introduction

In eukaryotic cells, secretory and integral membrane proteins are targeted to the endoplasmic reticulum (ER) by one of two different cellular systems: cotranslational or post-translational pathways (Rapoport *et al.*, 1996). In the cotranslational mechanism, the signal sequences within a nascent polypeptide are recognized by the signal recognition particle (SRP) and are targeted to the ER membrane via interaction with the SRP receptor. The post-translational pathway is SRP-independent and translocation occurs with the completed polypeptide chains. The preference for either pathway correlates with the hydrophobicity of the signal sequence of the translocated protein (Ng *et al.*, 1996; Martoglio & Dobberstein, 1998). Thus, signal sequences with high hydrophobicity bind to SRP with sufficient affinity and then SRP cotranslationally targets the nascent chain/ribosome complex to the translocon in the ER membrane. Conversely, if the signal sequence presents low

### Abstract

Rot1 is an essential yeast protein that has been related to cell wall biosynthesis, actin cytoskeleton dynamics and protein folding. Rot1 is an *N*-glycosylated protein anchored to the nuclear envelope–endoplasmic reticulum (ER) membrane by a transmembrane domain at its C-terminal end. Rot1 is translocated to the ER by a post-translational mechanism. Here, we investigate the protein domain required to target and translocate Rot1 to the ER membrane. We found that several deletions of the N-terminal region of Rot1 prevented neither membrane targeting nor the insertion of this protein. Interestingly, we obtained the same results when different truncated forms in the C-terminal transmembrane domain were analyzed, suggesting the presence of an internal topogenic element that is capable of translocating Rot1 to the ER. To identify this sequence, we generated a combination of N- and C-terminal deletion mutants of Rot1 and we investigated their insertion into the membrane. The results show that two regions, amino acids 26–60 and 200–228, are involved in the post-translational translocation of Rot1 across the ER membrane.

hydrophobicity, no productive interaction is formed with SRP, the translation process proceeds and the synthesized protein targets to the translocon assisted by the Sec62p/Sec63p complex (Deshaies *et al.*, 1991; Brodsky & Schekman, 1993; Panzner *et al.*, 1995). It is interesting to consider that proteins requiring both pathways have also been described. They contain signal sequences that are suboptimal for binding by SRP, and the fraction of the protein chains that does not interact productively with SRP uses the post-translational route. It is important to note that cotranslational targeting is the predominant pathway of ER sorting in mammalian cells and has been studied widely. The post-translational translocation of proteins was first described by Waters & Blobel (1986) (Hansen *et al.*, 1986; Waters & Blobel, 1986). Since then, however, only a few substrates that use this system have been examined (Ng *et al.*, 1996; Plath *et al.*, 1998; Rothe & Lehle, 1998).

Four classes of single-spanning membrane proteins can be distinguished based on their orientation in the lipid

bilayer and the topogenic sequences that direct their insertion into the ER (Higy *et al.*, 2004). Type I membrane proteins are initially targeted to the ER by a cleavable N-terminal signal sequence, and are then anchored onto the membrane by a subsequent stop transfer sequence that halts any further translocation of the polypeptide. Those proteins with an internal noncleavable signal sequence have been classified as type II and type III according to the respective cytosolic or luminal location of their N-terminus. They contain a single topogenic sequence that is responsible for both insertion and anchoring. In principle, such membrane protein types are inserted cotranslationally by machinery involving SRP, the SRP receptor and the Sec61 translocon. Yet, with type III proteins (Zhong & Guidotti, 1999; Zhong *et al.*, 2005) and some polytopic proteins (Kanner *et al.*, 2002) that possess large exoplasmic N-terminal domains, these domains must translocate post-translationally as they are synthesized in the cytoplasm before the signal anchor (transmembrane domain) appears. Finally, type IV proteins are cytoplasmically exposed proteins that are post-translationally anchored by a transmembrane segment very close to the C-terminus (C-tail anchored) (Borgese *et al.*, 2003).

Rot1 is an essential yeast protein that has been related to actin cytoskeleton dynamics during the cell cycle (Juanes *et al.*, 2007), cell wall biosynthesis (Bickle *et al.*, 1998; Machi *et al.*, 2004) and protein folding (Takeuchi *et al.*, 2006, 2008). Subcellular fractionation and immunofluorescence assays have demonstrated that Rot1 is a single spanning membrane protein localized at the nuclear envelope-ER network facing the lumen (Takeuchi *et al.*, 2006; Juanes *et al.*, 2008). Our previous work has revealed that Rot1 targets to the membrane by an SRP-independent post-translational mechanism involving the Sec63/Sec62 complex, and that it is attached to the ER membrane by a transmembrane domain at its C-terminal region (Juanes *et al.*, 2008). According to the protein database, the presence of a cleavable hydrophobic N-terminal signal peptide sequence is predicted for Rot1. However, we have previously provided evidence that Rot1, with its signal peptide sequence deleted, remained associated with the ER membrane (Juanes *et al.*, 2008). One question about the ER localization of Rot1 is raised: which signal sequence is recognized by the post-translational system to transport the Rot1 protein?

To further address the mechanism by which Rot1 is targeted and inserted into the ER membrane, we generated a series of truncations by individually or simultaneously deleting the N- and C-terminal ends of the protein. Using an efficient endoglycosidase assay and immunofluorescence assays with tagged Rot1-HA, we demonstrated the existence of previously unidentified internal topogenic sequences that mediate the translocation of the protein across the ER membrane.

## Materials and methods

### Yeast strains, genetic methods and plasmids

The yeast strains used in this study are shown in Table 1. The substitution of the *ROT1* promoter for the *GAL1* promoter and N-terminal tagging with three copies of the hemagglutinin (HA) epitope of the full-length Rot1 protein and N-terminal truncated Rot1 protein lacking amino acids 1–25, 1–60, 1–90 or 1–120 were achieved by integrating a DNA fragment amplified from plasmid pFA6a-kanMX6-PGAL1-3HA (Longtine *et al.*, 1998) at position +1 (JCY526), +76 (MCY62), +181 (MCY175), +271 (MCY232) or +361 (JCY1544) (Table 1). In the case of the MCY62, MCY175, MCY232 and JCY 1544 strains, cells were kept alive by the presence of a centromeric plasmid bearing the *ROT1* gene. A centromeric plasmid containing the *ROT1* gene was constructed by cloning a PCR amplified fragment expanding from –430 to +955 of the *ROT1* gene in YCplac33 to obtain plasmid pROT1-CEN.

C-terminal truncated Rot1 proteins lacking amino acids 150–256, 200–256 or 229–256 were achieved by integrating a DNA fragment amplified from the plasmid pFA6a-TRP1 (Longtine *et al.*, 1998) at position +286 (generating JCY1547), +601 (generating MCY243, MCY222 and MCY223) or +685 (MCY238, MCY240 and MCY241). Tagging of the Ole1 protein at the C terminus with green fluorescent protein (GFP) epitope was achieved by integrating a DNA fragment amplified from plasmid pFA6a-GFP (S65T)-HIS3MX6 (Longtine *et al.*, 1998).

Cells were grown on standard yeast extract peptone dextrose (YPD), galactose (YPGal)-rich medium, synthetic

**Table 1.** *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study

Strains	Genotypes
W303-1a	<i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3 can1</i>
MCY194f	<i>ROT1-HA-TRP1</i> en W303-1a
JCY526	<i>kanMX6-GAL1-3HA-ROT1</i> in W303-1a
MCY62	<i>kanMX6-GAL1-3HA-ROT1 (26–256)</i> in W303-1a pROT1
MCY175	<i>kanMX6-GAL1-3HA-ROT1 (61–256)</i> in W303-1a pROT1
MCY232	<i>kanMX6-GAL1-3HA-ROT1 (91–256)</i> in W303-1a pROT1
JCY1544	<i>kanMX6-GAL1-3HA-ROT1 (121–256)</i> in W303-1a pROT1
MCY238	<i>TRP1 ROT1 (26–228)</i> in MCY62
MCY240	<i>TRP1 ROT1 (61–228)</i> in MCY175
MCY241	<i>TRP1 ROT1 (91–228)</i> in MCY232
JCY1546	<i>TRP1 ROT1 (121–228)</i> in JCY1544
MCY243	<i>TRP1 ROT1 (26–199)</i> in MCY62
JCY1547	<i>TRP1 ROT1 (26–149)</i> in MCY62
MCY222	<i>TRP1 ROT1 (61–199)</i> in MCY175
MCY223	<i>TRP1 ROT1 (91–199)</i> in MCY232
JCY1265	<i>OLE1-GFP(S65T)-HIS3MX6</i> in MCY243
JCY1267	<i>OLE1-GFP(S65T)-HIS3MX6</i> in MCY240
JCY1269	<i>OLE1-GFP(S65T)-HIS3MX6</i> in MCY238
JCY1412	<i>OLE1-GFP(S65T)-HIS3MX6</i> in MCY222
JCY1413	<i>OLE1-GFP(S65T)-HIS3MX6</i> in MCY223
JCY1414	<i>OLE1-GFP(S65T)-HIS3MX6</i> in MCY241

dextrose (SD) or galactose (SGal) medium supplemented as required.

#### Western blot analysis

Approximately  $10^8$  cells were collected, resuspended in 100  $\mu$ L of water and after adding 100  $\mu$ L of 0.2 M NaOH, they were incubated for 10 min at room temperature. Cells were collected by centrifugation, resuspended in 50  $\mu$ L of sample buffer and incubated for 5 min at 95 °C. Extracts were clarified by centrifugation, and equivalent amounts of protein were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After transfer to nitrocellulose filters, tagged proteins were detected using the corresponding antibody (anti-HA 3F10 monoclonal antibody from Roche, anti-PSTAIRE antibody from Santa Cruz Biotech.) and the ECL Advance Western blotting detection Kit (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions.

#### Indirect immunofluorescence

Approximately  $10^8$  cells were collected and fixed in buffer A (0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.4) with 37% formaldehyde (1:10 dilution) for 120 min with agitation. After that, cells were collected, washed with buffer B (buffer A plus 1.2 M sorbitol) and incubated in 0.5 mL of buffer B containing 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol and 200  $\mu$ g of zymolyase 20-T per milliliter at 37 °C for 15 min. Spheroplasts were collected and washed with buffer B. An aliquot (5–10  $\mu$ L) was applied on multitest slide wells, blocked with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) for 20 min at 4 °C, resuspended in 10  $\mu$ L of a solution 0.4  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of rat anti-HA antibody 3F10 and incubated for 2 h at 4 °C. After washing with PBS–BSA, the secondary antibody Alexa 546-labeled anti-rat antibody (Molecular Probes) was added. To detect GFP-tagged proteins, spheroplasts were incubated with Alexa 488 rabbit anti-GFP (Molecular Probes) as indicated for the primary antibody. DNA was stained at the end of the process by incubating spheroplasts in PBS containing 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of DAPI (Sigma Inc.). Samples were analyzed in an Axioskop 2 Fluorescence Microscope (Zeiss Inc.) and pictures were taken using a SPOT digital camera (Diagnostic Instruments Inc.).

#### Glycosidase treatment

Approximately  $10^8$  cells were resuspended in 50 mM Tris-HCl at pH 7.5 supplemented with a mixture of protease inhibitors and broken with vigorous shaking in the presence of glass beads. The lysate was cleared of intact cells and debris by centrifugation at 2000 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was denatured by adding 1 vol. of denaturation

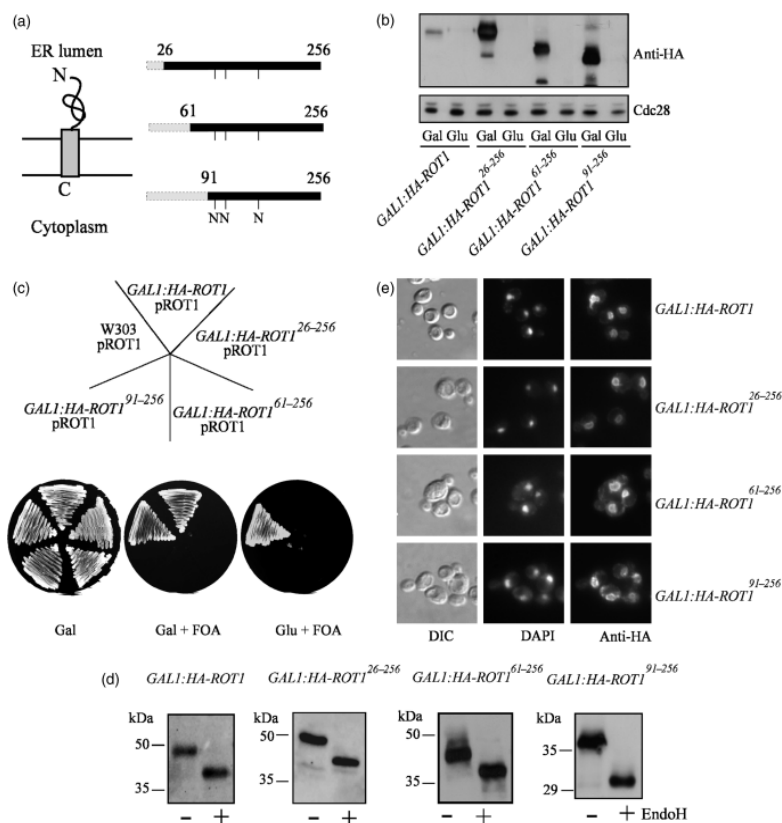
buffer (1 mM Tris-Cl pH 7.5, 40 mM DTT, 0.5% SDS) and incubated for 5 min at 95 °C. Samples were diluted twofold (0.25% SDS final concentration) and adjusted to a final concentration of 0.2 mM ammonium acetate, pH 5.5. The sample was divided into two aliquots: one aliquot was treated with 50 mU of endoglycosidase H (endoH, Roche), while the other was incubated with buffer at 37 °C for 2 h. Proteins were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted.

#### Subcellular fractionation

A crude extract from cells was prepared in 0.1 M sorbitol, 50 mM potassium acetate, 20 mM HEPES, pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM DTT plus protease inhibitors, by vigorous shaking of the cells in the presence of glass beads. Cell debris were pelleted at 700 g for 5 min, and the supernatant was divided into separate tubes, which were then subjected to one of the following treatments for 1 h on ice: buffer, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.5) or 1% Triton X-100 plus 0.5 M NaCl. After incubation, the samples were separated into supernatant (S) and pellet (P) fractions by centrifugation at 4 °C for 1 h at 100 000 g (rotor TLA-55 Beckman). Equivalent amounts of S and P fractions were subjected to SDS-PAGE and detected by immunoblotting with anti-HA antibodies.

#### Results

As a first attempt to identify the Rot1 signal required for transport to the ER membrane, we analyzed the localization of truncated variants of Rot1. We integrated a *GALI:HA* cassette at the genomic *ROT1* locus to generate either an N-terminal HA-tagged full-length Rot1 or different N-terminal HA-tagged truncated forms of Rot1 that lack amino acids 1–25 (Rot1<sup>26–256</sup>), 1–60 (Rot1<sup>61–256</sup>) and 1–90 (Rot1<sup>91–256</sup>) (Fig. 1a). The full-length and truncated proteins were expressed in a galactose-inducible manner (Fig. 1b). The construction of the truncated mutants was performed in cells containing a *URA3* centromeric plasmid bearing a wild-type *ROT1* gene because we have demonstrated that the deletion of amino acids 1–25 of Rot1 results in lethality (Juanes *et al.*, 2008). As expected, cells expressing Rot1<sup>61–256</sup> and Rot1<sup>91–256</sup> were also unviable when the plasmid carrying the wild-type *ROT1* was cured by the addition of 5-fluorotic acid (Fig. 1c). The deleterious effect of these N-terminal deletions would be expected if the N-terminal region contained the signal sequence responsible for the localization of the protein. Nevertheless, different results argue against this possibility. The fact that Rot1 is a glycosylated protein at the N103, N107 and N139 residues (Juanes *et al.*, 2008) proves most useful to unravel the correct localization of the protein. In eukaryotic cells, glycosylation activity takes place only in the lumen of the ER, and so the presence of a glycolytic moiety in a protein evidences its targeting to the ER. The glycosylation status of a protein can be verified by digesting

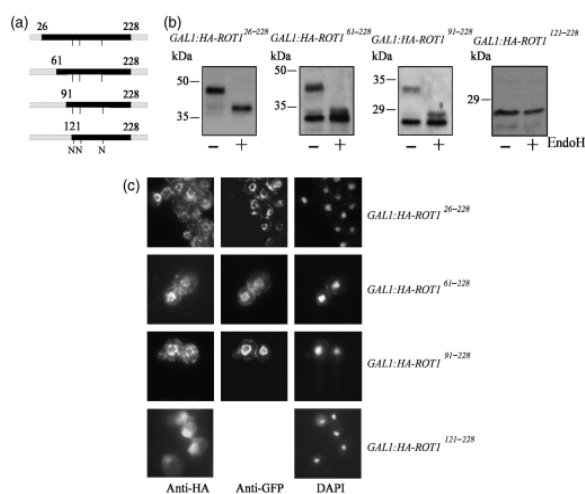


**Fig. 1.** Deletion of N terminal fragments does not prevent membrane targeting and translocation of Rot1 protein. (a) Schematic representation of membrane topology of Rot1 and linear representation of deletion constructs of Rot1. The gray box represents the deleted fragment in each truncated form. N, N-glycosylated positions. For the details of construction, see Materials and methods. (b) Western analysis of Rot1 protein and truncated forms in extracts from *GAL1:HA-ROT1* cells (JCY526), *GAL1:HA-ROT1<sup>26-256</sup>* (MCY62), *GAL1:HA-ROT1<sup>61-256</sup>* (MCY175) and *GAL1:HA-ROT1<sup>91-256</sup>* (MCY232) transformed with the pROT1-CEN plasmid grown on galactose or after incubation on glucose for 3 h (top panel). Cdc28 protein level is shown as a loading control (lower panel). (c) The wild-type strain (W303-1a), *GAL1:HA-ROT1* strain (JCY526) and *GAL1:HA-ROT1<sup>26-256</sup>* (MCY62), *GAL1:HA-ROT1<sup>61-256</sup>* (MCY175) and *GAL1:HA-ROT1<sup>91-256</sup>* (MCY232) truncated strains transformed with a *URA3* centromeric plasmid with the *ROT1* gene were streaked onto YPGal, YPGal and YPD plates containing 5-fluororotic acid (FOA) and incubated at 28 °C for 3 days. (d) Extracts from exponentially growing *GAL1:HA-ROT1* (JCY526), *GAL1:HA-ROT1<sup>26-256</sup>* (MCY62), *GAL1:HA-ROT1<sup>61-256</sup>* (MCY175) and *GAL1:HA-ROT1<sup>91-256</sup>* (MCY232) containing the pROT1-CEN plasmid were mock treated or digested with 50 mU of endoH. The proteins were analyzed by Western blot. (e) Cells from exponentially growing cultures of the *GAL1:HA-ROT1* (JCY526), *GAL1:HA-ROT1<sup>26-256</sup>* (MCY62), *GAL1:HA-ROT1<sup>61-256</sup>* (MCY175) and *GAL1:HA-ROT1<sup>91-256</sup>* (MCY232) strains were assayed by indirect immunofluorescence. DIC images, the Rot1-HA indirect-fluorescence signals (anti HA) and the DAPI staining of DNA are shown.

extracts with endoH because glycosylated and nonglycosylated variants of the protein are easily detected by their different electrophoretic mobilities. When the extracts from those cells expressing N-truncated Rot1 variants were

treated with endoH, a clear shift in the electrophoretic mobility was observed in all cases (Fig. 1d). This reveals that the Rot1 N-terminal truncated forms are N-glycosylated, and so they have been necessarily translocated across the

**Fig. 2.** Rot1 depleted of both the N- and the C-terminal domains are still translocated into the ER. (a) Schematic linear representation of the deletion constructs of Rot1. (b) Extracts from exponentially growing *GAL1:HA-ROT1*<sup>26–228</sup> (MCY 238), *GAL1:HA-ROT1*<sup>61–228</sup> (MCY240), *GAL1:HA-ROT1*<sup>91–228</sup> (MCY241) and *GAL1:HA-ROT1*<sup>121–228</sup> (JCY1546) cells containing the pROT1-CEN plasmid were mock treated or digested with 50 mU of endoH (Roche). The proteins were analyzed by Western blot. (c) Cells from exponentially growing cultures of the *GAL1:HA-ROT1*<sup>26–228</sup> (JCY1269), *GAL1:HA-ROT1*<sup>61–228</sup> (JCY1267), *GAL1:HA-ROT1*<sup>91–228</sup> (JCY1414) and *GAL1:HA-ROT1*<sup>121–228</sup> (JCY1546) strains transformed with a PCR cassette containing Ole1-GFP were assayed by indirect immunofluorescence. The Rot1-HA indirect-fluorescence signals (anti HA), Ole1-GFP (anti-GFP) and the DAPI staining of DNA are shown.

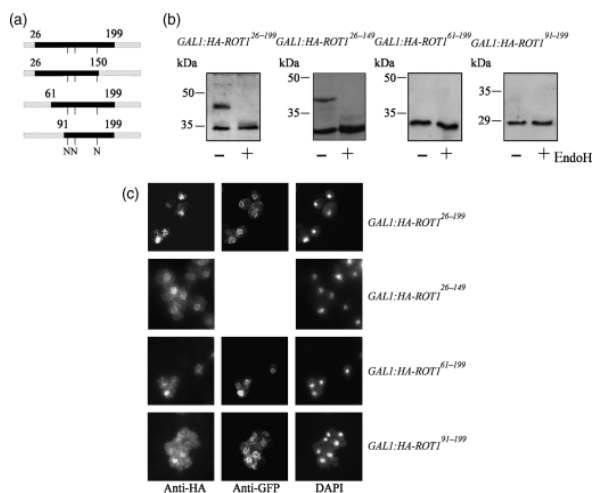


yeast ER membrane. Moreover, immunofluorescence analysis reinforced this conclusion: similar to that observed in wild-type Rot1, the N-truncated forms Rot1<sup>26–256</sup>, Rot<sup>61–256</sup> and Rot<sup>91–256</sup> were mainly located in the ER–nuclear envelope network (Fig. 1e). Collectively, these results indicate that despite the N-terminal sequence of Rot1 from amino acids 1–90 being required for the protein's essential cellular function, it is not necessary to either import the protein into the ER or for N-glycosylation. Otherwise, some sequences between 91 and 256 are sufficient for efficient targeting to the ER.

Hydrophobic internal segments have been proposed to be capable of promoting the translocation of the protein (Chen & Kendall, 1995; Ouzzine *et al.*, 1999). This prompted us to search for some structural features. The C-terminal transmembrane domain from amino acids 229–256 is the only hydrophobic domain of Rot1. Elimination of this transmembrane domain affects the anchoring of Rot1 to the membrane, but not the targeting to the ER; thus, the protein locates in the lumen (Juanes *et al.*, 2008). To definitely rule out a role of this C-terminal transmembrane domain in targeting, we deleted it from the N-terminal truncated forms to yield the mutant proteins Rot1<sup>26–228</sup>, Rot1<sup>61–228</sup>, Rot1<sup>91–228</sup> and Rot1<sup>121–228</sup> (Fig. 2a). When these truncated forms were observed after endoH treatment, a down-shift in electrophoretic mobility was observed in the three first constructs, whereas no down-shift was observed in Rot1<sup>121–228</sup> (Fig. 2b). This means that proteins Rot1<sup>26–228</sup>, Rot1<sup>61–228</sup> and Rot1<sup>91–228</sup> are N-glycosylated; thus, they have been necessarily translocated to the

ER to be modified. This conclusion was reinforced by immunofluorescence assays, which show a staining pattern for Rot1<sup>26–228</sup>, Rot1<sup>61–228</sup> and Rot1<sup>91–228</sup> in the ER–nuclear envelope network that overlaps that of Ole1-GFP, a typical ER membrane-bound marker protein, whereas no ER–nuclear envelope pattern was observed for Rot1<sup>121–228</sup> (Fig. 2c). It should be noted that for the Rot1<sup>61–228</sup> and Rot1<sup>91–228</sup> truncated forms, two protein bands were observed with the untreated samples in the Western blots, which correspond to the glycosylated and nonglycosylated variants of the protein. This indicates that a fraction of the proteins Rot1<sup>61–228</sup> and Rot1<sup>91–228</sup> was not modified. Despite the lack of modification reflecting a possible defect in the ER translocation, we cannot rule out that proteins were properly targeted to the ER and that they could not be glycosylated. Together, these results suggest that neither the N-terminal domain (corresponding amino acids 1–90) nor the C-terminal domain (amino acids 228–256) *per se* contains the information required for the targeting of Rot1. Nonetheless, the fragment from 26 to 60 may prove important for efficient targeting, while that from 90 to 120 could also help to direct the protein to the ER.

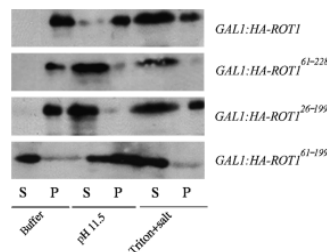
To further restrict the position of the internal putative signal-like region, a larger C-terminal deletion from amino acid 150 or 200 to the end was combined with the N-terminal deletions used above (Fig. 3a). For Rot1<sup>26–199</sup> and Rot1<sup>26–149</sup>, the endoH assay reveals the presence of a glycosylated form of the protein (Fig. 3b). This indicates that some protein was still translocated to the ER. However, it has to be stated that in contrast to that observed with the



**Fig. 3.** Severe truncated forms of Rot1 are mislocated. (a) Schematic linear representation of the deletion constructs of Rot1. (b) Extracts from exponentially growing *GAL1:HA-ROT1*<sup>26-199</sup> (MCY243), *GAL1:HA-ROT1*<sup>26-149</sup> (JCY1547), *GAL1:HA-ROT1*<sup>61-199</sup> (MCY222) and *GAL1:HA-ROT1*<sup>91-199</sup> (MCY223) cells (MCY223) containing the pROT1-CEN plasmid were mock treated or digested with 50 mU of endoH. The proteins were analyzed by Western blot. (c) Cells from exponentially growing cultures of the *GAL1:HA-ROT1*<sup>26-199</sup> (JCY1265), *GAL1:HA-ROT1*<sup>26-149</sup> (JCY1547), *GAL1:HA-ROT1*<sup>61-199</sup> (JCY1412) and *GAL1:HA-ROT1*<sup>91-199</sup> (JCY1413) strains containing Ole1-GFP protein were assayed by indirect immunofluorescence. The Rot1-HA indirect-fluorescence signals (anti HA), Ole1-GFP (anti-GFP) and the DAPI staining of DNA are shown.

*Rot1*<sup>26-228</sup> protein, a significant fraction of the *Rot1*<sup>26-199</sup> and *Rot1*<sup>26-149</sup> proteins was present as the nonglycosylated variant before endoH treatment. This could suggest inefficient transport to the ER. In accordance with these results, the immunofluorescence assay for *Rot1*<sup>26-199</sup> and *Rot1*<sup>26-149</sup> shows a pattern consistent with the location in the ER, but it was more diffuse and less resembled a clear ER–nuclear envelope network than that observed for the *Rot1*<sup>26-228</sup> protein (Fig. 3c). All these observations strongly suggest that the elimination of the region from 200 to 228 has a negative effect on the ER localization of Rot1. This conclusion is reinforced by the fact that *Rot1*<sup>61-199</sup> and *Rot1*<sup>91-199</sup> (opposite to *Rot1*<sup>61-228</sup> and *Rot1*<sup>90-228</sup>) were not glycosylated at all as evidenced by a null decrease of the apparent molecular mass after endoH treatment. Moreover, the immunofluorescence assays of cells show that while the Ole1-GFP signal revealed an ER–nuclear envelope membrane network, the truncated *Rot1*<sup>61-199</sup> and *Rot1*<sup>91-199</sup> forms presented a dramatically diffuse and different pattern in which the signal overlapped the area of the nucleus, which is consistent with a mislocation of the protein. Thus, the aforementioned ability of *Rot1*<sup>61-228</sup> and *Rot1*<sup>91-228</sup> to reach the ER (although probably with reduced efficiency) was completely abolished in *Rot1*<sup>61-199</sup> and *Rot1*<sup>91-199</sup>, indicating that the sequence from 200 to 228 is important for the proper ER targeting of Rot1.

It is important to note that the same results as those described above in the endoH digestion assay were obtained when the truncated Rot1 proteins were expressed at the endogenous level (Supporting Information, Fig. S1), thus ruling out possible artifacts due to overexpression.



**Fig. 4.** Association of several truncated forms of Rot1 with membranes. Extracts from exponentially growing cultures of the *GAL1:HA-ROT1* (JCY526), *GAL1:HA-ROT1*<sup>61-228</sup> (JCY1267), *GAL1:HA-ROT1*<sup>26-199</sup> (MCY243) and *GAL1:HA-ROT1*<sup>61-199</sup> (MCY222) were treated with buffer or 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.5) or 1% Triton X-100 plus 0.5 M NaCl and divided into pellet (P) and supernatant (S) fractions by high-speed centrifugation. The Rot1 proteins were examined by Western analysis.

Finally, we also analyzed the association of some truncated forms of Rot1 with the membrane by subcellular fractionation. Cells were lysed and extracts were separated by high-speed centrifugation into pellet (P) and supernatant (S) fractions after different treatments, including incubation in buffer, sodium carbonate pH 11.5 (a treatment that releases ER luminal and peripheral membrane proteins) and Triton X-100 plus salt (a treatment that releases integral membrane proteins). *Rot1*<sup>61-228</sup> and *Rot1*<sup>26-199</sup>, as well as the control Rot1, were detected in the membrane fraction (Fig. 4). Rot1 behaved like a typical integral membrane protein because it was extracted from the membrane



fraction only after incubation with detergent plus salt. However, the Rot1<sup>61–228</sup> and Rot1<sup>26–199</sup> proteins behaved like luminal proteins because they were also extracted with alkaline solution, which was expected because they lack the C-terminal transmembrane domain. Importantly, in the case of Rot1<sup>61–199</sup>, the subcellular fractionation analysis reveals how a significant fraction of the protein was recovered in the soluble fraction with no solubilization treatment. All these results are consistent with those obtained in the endoH digestion and immunofluorescence assays, and further prove that Rot1<sup>61–228</sup> and Rot1<sup>26–199</sup> are translocated to the ER, whereas Rot1<sup>61–199</sup> is mislocalized and not translocated to the ER.

### Discussion

After having demonstrated previously that the Rot1 protein is post-translationally targeted to the ER membrane, our aim was to identify the region(s) of Rot1 that direct(s) the protein to the membrane. We investigated the location of the signal(s) sequence by generating a range of the N- and C-terminal deletions. The ER targeting of the full-length and truncated forms was analyzed by endoglycosidase digestion and immunofluorescence localization assays. We found that two small internal fragments of the protein such as Rot1<sup>26–149</sup> and Rot1<sup>91–228</sup> are still able to localize into the ER, although not as efficiently as the full protein. Therefore, these internal regions contain topologic information for the targeting and translocation of the protein into the ER. However, a detailed analysis of the results obtained with the different truncated forms of Rot1 revealed a complex situation. When the region from 200 to 228 was removed in Rot1<sup>91–228</sup>, the resulting Rot1<sup>91–200</sup> peptide delocalized totally. A similar result was obtained with the larger fragment Rot1<sup>61–228</sup>. These results suggest that the domain from amino acids 200 to 228 is important for the translocation of Rot1 to the ER. Nevertheless, different observations indicate that this single domain cannot be the only fragment responsible for the targeting of Rot1 because some truncated versions of Rot1 lacking this domain, for example Rot1<sup>26–149</sup>, Rot1<sup>26–199</sup> and Rot1<sup>1–199</sup> (results not shown), were glycosylated and located in the ER membrane. All these studies are consistent with the existence of an internal domain other than the fragment 200–228, which is also able to direct the protein to the ER. This region should be from amino acid 26 to 60 because Rot1<sup>61–199</sup> totally delocalizes opposite to Rot1<sup>26–199</sup>. In summary, we propose the existence of two topogenic domains important for the translocation of Rot1 to the ER: one from amino acids 26 to 60 and another from amino acids 200 to 228. Neither is essential for Rot1 ER targeting because the removal of either region does not completely abolish the translocation of the protein to the ER. Therefore, it is possible that these two fragments

contain independent topogenic signals that are functionally redundant. Nevertheless, none of these sequences is able to target a reporter protein, such as GFP, to the ER membrane (results not shown). This fact could indicate that these domains may interact with adjacent sequences to perform the targeting function. Alternatively, natural signal sequences are remarkably diverse and numerous anecdotal observations in various systems suggest that signal sequences are not always interchangeable. It is important to note that an increasing number of human membrane proteins that contain a combination of topogenic elements in order to accomplish their correct subcellular localization have been described (Lu *et al.*, 1998; Heine *et al.*, 2007). In this sense, it is tempting to speculate that Rot1 could contain a number of such sequences, which might contribute or collaborate in acquiring a defined structure that is able to ensure the efficiency of the ER import. Alternatively, these two fragments could contribute to the acquisition of the proper structure to allow Rot1 interactions with other proteins to accomplish an efficient post-translational translocation to the ER.

In a previous work, we demonstrated that Rot1 inserted into the membrane post-translationally (Juanes *et al.*, 2008). This is also the case for a truncated form of Rot1 lacking the N- and C-terminal regions (Rot1<sup>26–228</sup>), which is translocated to the ER membrane through the Sec61 translocon by an SRP-independent post-translational mechanism involving the Sec63–Sec62 complex, a complex that has been described to date only in yeast (Fig. S2). Thus, Rot1 differs from typical type III membrane proteins (those with a luminal orientation of the N-terminal end), which use the general cotranslational mechanism to translocate into the ER (Goder & Spiess, 2001). Nevertheless, post-translational translocation has to be considered for a group of unusual type III membrane proteins. Type III proteins usually exhibit a short exoplasmic N-terminal domain that is easily translocated across the membrane. However, there is an increasing number of cases of unusual type III membrane proteins with a long luminal N-terminus, such as yeast Golgi ecto-ATPase Ynd1p (Zhong & Guidotti, 1999; Zhong *et al.*, 2005), worm proteins UNC5 (Leung-Hagesteijn *et al.*, 1992) and C33H5.14 (Wang *et al.*, 1998), rat protein NTAK (Higashiyama *et al.*, 1997) and the human Neu differentiation factor (Wen *et al.*, 1992). For these proteins, the existence of a new translocation mechanism that differs from those of the normal type III has been suggested (Zhong *et al.*, 2005) because the large N-terminus (ranging from 228 to 500 residues) must be translocated post-translationally through the translocase complex across the ER membrane. Rot1 exhibits a long exoplasmic N-tail (228 residues) and could represent an example of this group of post-translationally translocated long luminal N-terminus proteins.

Recently, Hegde & Kang (2008) have reviewed that one essential element regulating the translocation process is the

interaction of proteins with the Sec61 translocon complex. Substrates must interact and open a normally closed channel. The authors propose an analogous mechanism to a ratchet-based translocation model (Matlack *et al.*, 1999) involving a transiently sampled configuration that is trapped on the luminal side of the ER by, for instance, a chaperone or oligosyltransferases. This mechanism is often involved in post-translational systems and is substrate-specific because it depends on the position of the glycosylation sites, the presence or absence of good chaperone binding sites and the signal sequence, which would determine how long a particular trapping-competent configuration is sampled. For Rot1, we propose that several important regions are involved in translocation, which would interact not only with Sec61, but probably also with other ER luminal proteins. This model might prove sufficient for some small fragment of the protein to appear in the ER lumen, to be captured by Sec62, BiP or the oligosyltransferase, and to be easily translocated. The interaction of Rot1 with these proteins has been described (Takeuchi *et al.*, 2006; Juanes *et al.*, 2008), which could support the idea that Rot1 might be translocated with the help of luminal proteins.

In short, Rot1 is an unusual membrane protein with respect to its targeting and translocation to the ER that presents new scenarios in protein targeting and translocation to the ER. Future research into the mechanisms by which Rot1 is properly inserted and assembled into membranes will extend our current understanding of membrane biology.

### Acknowledgements

This work was supported by Grants BFU2007-67929-C02-02 from Ministerio de Ciencia y Tecnología of the Spanish Government and ACOMP07/086 from Generalitat Valenciana. M.A.J. was a recipient of a Predoctoral Fellowship from Generalitat Valenciana.

### References

- Bickle M, Delley PA, Schmidt A & Hall MN (1998) Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J* **17**: 2235–2245.
- Borgese N, Brambillasca S, Soffientini P, Yabal M & Makarow M (2003) Biogenesis of tail-anchored proteins. *Biochem Soc T* **31**: 1238–1242.
- Brodsky JL & Schekman R (1993) A Sec63p–BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol* **123**: 1355–1363.
- Chen H & Kendall DA (1995) Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *J Biol Chem* **270**: 14115–14122.
- Deshaies RJ, Sanders SL, Feldheim DA & Schekman R (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* **349**: 806–808.
- Goder V & Spiess M (2001) Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett* **504**: 87–93.
- Hansen W, Garcia PD & Walter P (1986) *In vitro* protein translocation across the yeast endoplasmic reticulum: ATP-dependent posttranslational translocation of the prepro-alpha-factor. *Cell* **45**: 397–406.
- Hegde RS & Kang SW (2008) The concept of translocational regulation. *J Cell Biol* **182**: 225–232.
- Heine C, Quitsch A, Storch S *et al.* (2007) Topology and endoplasmic reticulum retention signals of the lysosomal storage disease-related membrane protein CLN6. *Mol Membr Biol* **24**: 74–87.
- Higashiyama S, Horikawa M, Yamada K *et al.* (1997) A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4. *J Biochem* **122**: 675–680.
- Higy M, Junne T & Spiess M (2004) Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **43**: 12716–12722.
- Juanes MA, Queralt E, Bano MC & Igual JC (2007) Rot1 plays an antagonistic role to Clb2 in actin cytoskeleton dynamics throughout the cell cycle. *J Cell Sci* **120**: 2390–2401.
- Juanes MA, Igual JC & Bano MC (2008) Membrane topology and post-translational modification of the *Saccharomyces cerevisiae* essential protein Rot1. *Yeast* **25**: 93–106.
- Kanner EM, Klein IK, Friedlander M & Simon SM (2002) The amino terminus of opsin translocates 'posttranslationally' as efficiently as cotranslationally. *Biochemistry* **41**: 7707–7715.
- Leung-Hagesteijn C, Spence AM, Stern BD, Zhou Y, Su MW, Hedgecock EM & Culotti JG (1992) UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* **71**: 289–299.
- Longtine MS, McKenzie A III, Demarini DJ *et al.* (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953–961.
- Lu Y, Xiong X, Helm A, Kimani K, Bragin A & Skach WR (1998) Co- and posttranslational translocation mechanisms direct cystic fibrosis transmembrane conductance regulator N terminus transmembrane assembly. *J Biol Chem* **273**: 568–576.
- Machi K, Azuma M, Igarashi K, Matsumoto T, Fukuda H, Kondo A & Ooshima H (2004) Rot1p of *Saccharomyces cerevisiae* is a putative membrane protein required for normal levels of the cell wall 1,6-beta-glucan. *Microbiology* **150**: 3163–3173.
- Martoglio B & Dobberstein B (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* **8**: 410–415.
- Matlack KE, Misselwitz B, Plath K & Rapoport (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* **97**: 553–564.

- Ng DT, Brown JD & Walter P (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**: 269–278.
- Ouzzine M, Magdalou J, Burchell B & Fournel-Gigleux S (1999) An internal signal sequence mediates the targeting and retention of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A6 to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **274**: 31401–31409.
- Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S & Rapoport TA (1995) Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* **81**: 561–570.
- 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**: 795–807.
- Rapoport TA, Jungnickel B & Kutay U (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* **65**: 271–303.
- Rothe C & Lehle L (1998) Sorting of invertase signal peptide mutants in yeast dependent and independent on the signal-recognition particle. *Eur J Biochem* **252**: 16–24.
- Takeuchi M, Kimata Y, Hirata A, Oka M & Kohno K (2006) *Saccharomyces cerevisiae* Rot1p is an ER-localized membrane protein that may function with BiP/Kar2p in protein folding. *J Biochem* **139**: 597–605.
- Takeuchi M, Kimata Y & Kohno K (2008) *Saccharomyces cerevisiae* Rot1 is an essential molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **19**: 3514–3525.
- Wang TF, Ou Y & Guidotti G (1998) The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J Biol Chem* **273**: 24814–24821.
- Waters MG & Blobel G (1986) Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis. *J Cell Biol* **102**: 1543–1550.
- Wen D, Peles E, Cupples R *et al.* (1992) Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* **69**: 559–572.
- Zhong X & Guidotti G (1999) A yeast Golgi E-type ATPase with an unusual membrane topology. *J Biol Chem* **274**: 32704–32711.
- Zhong X, Malhotra R & Guidotti G (2005) A eukaryotic carboxyl-terminal signal sequence translocating large hydrophilic domains across membranes. *FEBS Lett* **579**: 5643–5650.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Fig. S1.** Analysis of the glycosylation of truncated forms of Rot1 expressed at endogenous level.

**Fig. S2.** Mechanism of Rot1<sup>26–228</sup> targeting to the endoplasmic reticulum.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

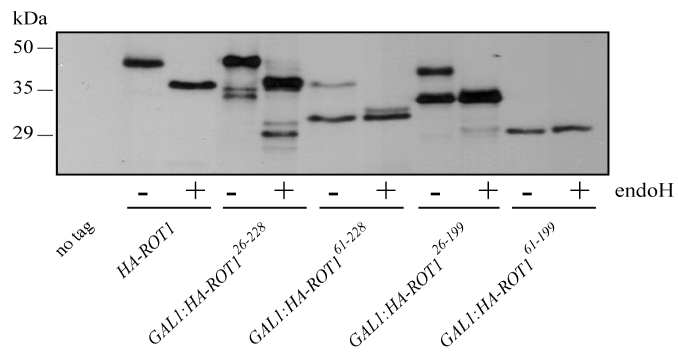
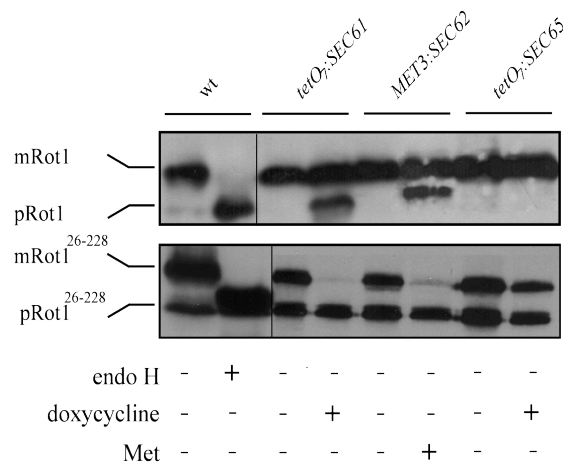


Figure S1

**Figure S1. Analysis of the glycosylation of truncated forms of Rot1 expressed at endogenous level.** Extracts from *HA-ROT1*(MCY194) cells grown on YPD medium and *GAL1:HA-ROT1*<sup>26-228</sup>(MCY 238), *GAL1:HA-ROT1*<sup>61-228</sup>(MCY240), *GAL1:HA-ROT1*<sup>26-199</sup>(MCY243) and *GAL1:HA-ROT1*<sup>61-199</sup>(MCY222) cells containing the pROT1-CEN plasmid grown on synthetic medium plus 0.1% galactose were mock treated or digested with 50mU of endoH. The proteins were analyzed by western-blot.



Juanes et al. Figure S2

**Figure S2. Mechanism of Rot1<sup>26-228</sup> targeting to the endoplasmic reticulum.**

Exponentially growing cells in synthetic raffinose medium of the *tetO<sub>7</sub>:SEC61*, *MET3:SEC62*, and *tetO<sub>7</sub>:SEC65* strains transformed with plasmids GAL1:HA-ROT1 or GAL:HA-ROT1<sup>26-228</sup>, were incubated overnight in the absence or presence of 4mM methionine (*sec62* mutant) or of 10μg/ml doxycycline (*sec61* and *sec65* mutants). Then, 2% galactose was added to the medium to induce the gene expression for 20 min. Cell extracts were analysed by western blot. Control extracts from the wild-type cells containing each plasmid after digestion with endoH are included. The precursor and mature forms of the proteins are labelled as p and m, respectively.