

# Biogénesis y plegamiento de proteínas de membrana



**Silvia Tamborero Capilla**  
2011

# Biogénesis y plegamiento de proteínas de membrana

---



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**Silvia Tamborero Capilla**  
**2011**

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

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

Manifiesta: que Dña. Silvia Tamborero Capilla, Licenciada en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título "Biogénesis y plegamiento de proteínas de membrana" presenta para optar al grado de Doctora.

Y para que así conste, y produzca los efectos oportunos donde proceda, firmo la presente acreditación en Burjassot a 10 de marzo de 2011.



Dr. Ismael Mingarro

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	i
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>I1 LA MEMBRANA BIOLÓGICA.</b>	3
I1.A. Estructura de la membrana lipídica.	3
I1.B. El componente proteico.	6
<b>I2. DIRECCIONAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS A LAS MEMBRANAS.</b>	8
I2.A. Mecanismo de inserción/translocación cotraduccional.	9
I2.B. La ruta postraduccional de translocación.	12
I2.C. Otros sistemas de translocación/inserción.	15
<b>I3. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL TRANSLOCÓN.</b>	17
I3.A. Estructura del translocón.	19
I3.B. Mecanismo de acción del translocón.	22
I3.C. Proteínas asociadas al heterotrímero Sec61.	29
I3.D. Estequiometría del translocón.	33
<b>I4. PAPEL DEL RIBOSOMA EN LOS PROCESOS DE TRANSLOCACIÓN E INSERCIÓN COTRADUCCIONAL.</b>	36
I4.A. El túnel de salida de la subunidad grande.	37
I4.B. Regulación de la inserción cotraduccional desde el interior del ribosoma.	40
<b>I5. TOPOGÉNESIS Y PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.</b>	42

15.A. Determinantes topológicos.	46
15.B. Interacciones implicadas en el plegamiento de proteínas de membrana.	49
<b>OBJETIVOS</b>	55
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	59
R1. PLEGAMIENTO DE FRAGMENTOS TM EN EL TÚNEL DE SALIDA DEL RIBOSOMA. DETERMINANTES DEL PLEGAMIENTO.	61
R1.A. ANTECEDENTES.	62
R1.B. PLEGAMIENTO DE FRAGMENTOS TM DENTRO DEL TÚNEL DEL RIBOSOMA.	66
R1.C. CARACTERÍSTICAS QUE DETERMINAN EL PLEGAMIENTO DENTRO DEL RIBOSOMA.	81
R1.C1. La hidrofobicidad y la helicidad son requeridas para la compactación de secuencias cerca del sitio P.	82
R1.C2. Especificidad de residuos en posiciones concretas.	85
R1.C3. Segmentos hidrofóbicos cortos poseen una menor tendencia a la compactación que TMs de longitud canónica.	88
R1.D. DEMOSTRACIÓN DEL PLEGAMIENTO EN EL TÚNEL MEDIANTE PROTEÓLISIS	91
R1.E. PLEGAMIENTO EN EL TRANSLOCÓN.	94
R1.E1. Plegamiento de cadenas nacientes en el canal del translocón.	94
R1.E2. Interacción del TM de gp41 con la proteína TRAM durante el proceso de inserción en la bicapa.	96

R2. BIOGÉNESIS, TOPOLOGÍA Y ENSAYOS FUNCIONALES DE LA PROTEÍNA TRAM EN MEMBRANAS DEL RE.	103
R2.A. ANTECEDENTES.	104
R2.B. BIOGÉNESIS Y TOPOLOGÍA DE TRAM.	108
R2.B1. TRAM se integra cotraduccionalmente en la membrana del RE.	108
R2.B2. TRAM se integra en membranas del RE utilizando la SRP y el translocón.	111
R2.B3. Determinación de la topología de TRAM.	116
R2.C. LA DEPLECIÓN DE LA TRAM MICROSOMAL ENDÓGENA AFECTA A LA INSERCIÓN DE LA PROPIA TRAM.	124
R2.D. DISECCIONANDO EL ENSAMBLAJE DE TRAM.	128
R2.D1. Inserción independiente de los segmentos TM de TRAM marginalmente hidrofóbicos.	128
R2.D2. Influencia de los segmentos TM adyacentes en la inserción de segmentos marginalmente hidrofóbicos.	133
R2.E. REQUERIMIENTO DE TRAM DURANTE LOS PROCESOS DE INSERCIÓN EN LA MEMBRANA: INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TRAM MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA.	140
<b>CONCLUSIONES</b>	151
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	155
M1. MATERIAL BIOLÓGICO.	157
M1.A. Manipulación de la bacteria <i>Escherichia coli</i> .	157
M1.B. Cultivo de líneas celulares humanas.	159

M2. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE DNA.	161
M2.A. Obtención de DNA plasmídico.	161
M2.B. Amplificación de DNA mediante PCR.	161
M2.C. Mutagénesis dirigida.	162
M2.D. Realización de construcciones: digestión de DNA y ligación.	162
M2.E. Secuenciación de DNA.	163
M3. VECTORES Y DISEÑO DE CONSTRUCCIONES.	163
M3.A. Construcciones para estudio de plegamiento de cadenas nacientes.	163
M3.B. Construcciones para estudiar la capacidad de inserción en membranas.	164
M3.C. Sistemas utilizados para la expresión de TRAM.	165
M3.D. Plásmido para fotoentrecruzamiento de TRAM e inserción de la proteína p9 en células con la expresión de TRAM afectada.	167
M4. TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i> .	168
M4.A. Transcripción <i>in vitro</i> .	168
M4.B. Traducción <i>in vitro</i> .	168
M4.C. Sedimentación de membranas.	170
M5. ENTRECRUZAMIENTO DE INTERMEDIARIOS DE TRADUCCIÓN.	171
M5.A. Entrecruzamiento químico.	171
M5.B. Fotoentrecruzamiento.	172
M6. PREPARACIÓN DE CÉLULAS SEMIPERMEABILIZADAS.	173

M7. ENSAYOS ENZIMÁTICOS.	175
M7.A. Endoglicosidasa H.	175
M7.B. Digestión con proteinasa K.	176
M8. ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LAS SECUENCIAS PROTEICAS.	177
M9. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN.	178
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	181



# INTRODUCCIÓN

---



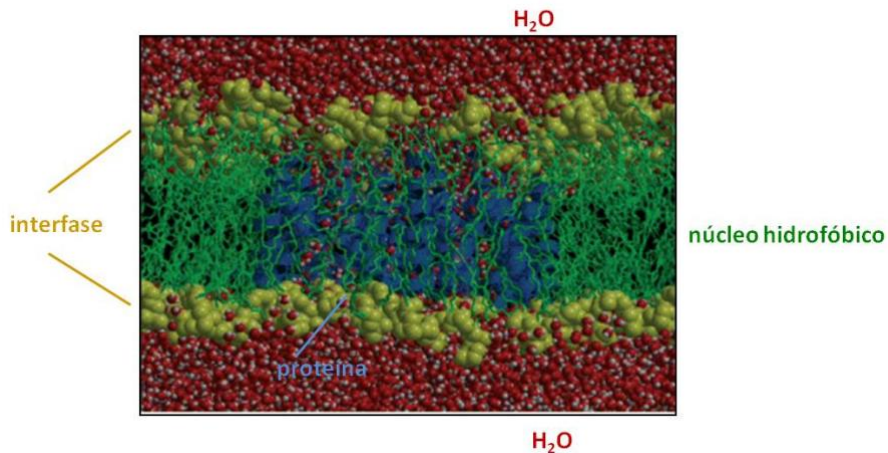
## **I1. LA MEMBRANA BIOLÓGICA.**

Todas las células, ya sean bacterias, arqueas o eucariotas están delimitadas por membranas. Las membranas biológicas están compuestas principalmente por lípidos estructurados en dos monocapas enfrentadas, por lo que también se les denomina bicapas lipídicas. La membrana, además de definir los límites tanto celulares como organulares y establecer una barrera al tráfico de moléculas de unos compartimentos a otros, posee otras funciones importantes para la supervivencia celular, como el transporte selectivo, la producción de energía requerida para los procesos catalíticos y la transducción de señales.

### **I1.A. ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA LIPÍDICA.**

Los fosfolípidos que componen las membranas biológicas son moléculas anfipáticas que consisten en una cola hidrocarbonada altamente hidrofóbica y una cabeza de naturaleza hidrofílica que contiene grupos fosfato. La formación de la bicapa obedece al llamado efecto hidrofóbico por el que las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se asocian entre sí excluyendo el agua mientras que las cabezas polares interactúan con el medio acuoso. Las cabezas hidrofílicas forman una interfase que separa el núcleo hidrocarbonado del entorno acuoso de una forma gradual. La zona interfacial no supone un cambio brusco de ambiente químico, sino que la hidrofobicidad va disminuyendo gradualmente. El núcleo hidrofóbico ocupa aproximadamente unos 30 Å de grosor y la interfase se extiende unos 15 Å a ambos lados del mismo (figura I1.A). Las colas hidrocarbonadas y las cabezas polares de los lípidos pueden tener diferentes características

(longitud de la cadena hidrocarbonada, carga de la cabeza polar, rigidez, etc.) y esto confiere una gran heterogeneidad química a la membrana.



**Figura I1.A. La bicapa lipídica.** Simulación por dinámica molecular de la proteína acuaporina embebida en la membrana. Las moléculas de agua pueden penetrar hasta la interfase, pero no lo hacen en el núcleo hidrocarbonado. El núcleo hidrofóbico está constituido por las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos y la interfase por las cabezas polares. Modificado de (von Heijne, 2007).

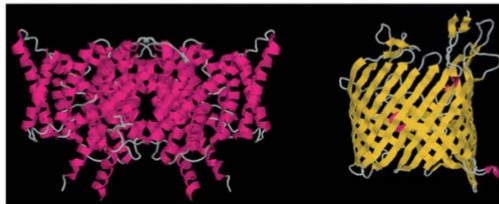
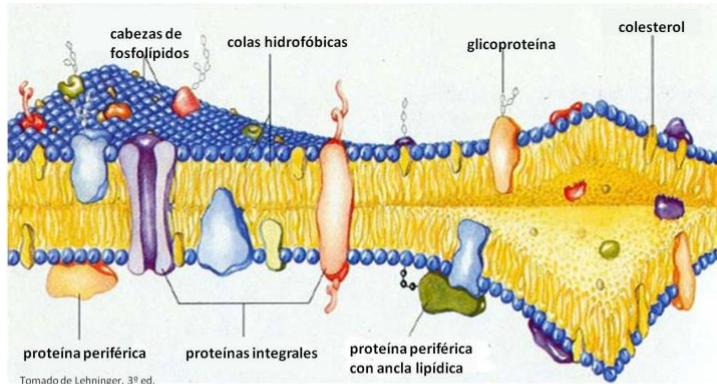
Los fosfolípidos son los lípidos mayoritarios en las bicapas pero existen otros tipos de lípidos en proporciones menores, como por ejemplo los glicolípidos y el colesterol. El colesterol es un lípido que confiere rigidez y estabilidad a la membrana y que se encuentra distribuido de forma desigual a lo largo de la membrana. Actualmente se considera que las membranas son estructuras altamente complejas y variables, con dominios específicos que excluyen o agrupan a determinadas proteínas de manera específica, como es el caso de las balsas lipídicas (*lipid rafts*), ricas en colesterol y esfingolípidos.

## **11.B. EL COMPONENTE PROTEICO.**

La relación proteína:lípido en peso en la mayoría de las membranas es aproximadamente 1:1 (Muller et al., 2008). Las proteínas de membrana son aquellas que residen en la bicapa lipídica y pueden clasificarse en dos grupos: proteínas integrales de membrana, cuando la atraviesan completamente, y proteínas periféricas o asociadas a la membrana, que son aquellas que permanecen unidas a la bicapa porque interaccionan con otra proteína, lípido o residuo glucídico, aunque también se consideran asociadas cuando son capaces de penetrar parcialmente en la membrana pero no de atravesarla completamente (figura 11.B).

Los motivos estructurales capaces de existir en el interior de una membrana son los barriles beta y las hélices alfa, siendo muy mayoritario el segundo. Este tipo de estructura facilita la inserción en la membrana de los esqueletos polipeptídicos ya que establecen puentes de hidrógeno intramoleculares reduciéndose así la polaridad de los grupos CO y NH del enlace peptídico, lo que facilita termodinámicamente la inserción dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana. En lo que a las hélices alfa transmembranales se refiere, los residuos de aminoácidos que las forman se localizan en una distribución determinada dentro de la estructura de la bicapa dependiendo de sus características químico-físicas. Lo más frecuente es que en el núcleo hidrofóbico se encuentren aminoácidos hidrofóbicos (L, I, V, A, F, M) y que los residuos polares o cargados lo hagan en localizaciones interfaciales o incluso extramembranas, aunque existen ejemplos en los que fragmentos TM tienen aminoácidos cargados embebidos en el medio de la membrana (Kauko et al., 2010). Trp y Tyr tienen tendencia a localizarse en las interfases (Granseth et al., 2005; Yau et

al., 1998) y favorecen el anclaje de la hélice a la membrana (de Planque et al., 2003).



**Figura 11.B. Las proteínas de las membranas.** El panel superior muestra un dibujo de la bicapa lipídica con los distintos tipos de proteínas de membrana. En el panel inferior se muestra la estructura de una proteína de membrana formada por estructuras en hélice alfa (el canal de cloro, a la izquierda) y otra en forma de barril beta (maltopirina, a la derecha).

Además de las hélices alfas canónicas que atraviesan totalmente la membrana, en proteínas politópicas (con más de un fragmento transmembrana) pueden existir otras estructuras helicoidales menos convencionales denominadas lazos re-entrantes (*reentrant loops*) (Lasso et al., 2006; Viklund et al., 2006). Se trata de regiones (frecuentemente formadas por un fragmento de hélice alfa, un lazo y otro fragmento de hélice alfa) que penetran en la membrana pero no llegan a atravesarla entrando y saliendo por el mismo lado de la bicapa.

## **12. DIRECCIONAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS A LAS MEMBRANAS.**

La problemática de la biogénesis de una proteína de membrana concierne dos aspectos básicos: la inserción de los segmentos transmembrana y el proceso de plegamiento para establecer su estructura nativa. El proceso de plegamiento en estos casos tiene lugar mediante mecanismos diferentes a los empleados por los polipéptidos solubles ya que las características químico-físicas del entorno son radicalmente distintas al medio acuoso en el que ocurre el plegamiento de las proteínas globulares. Además, tanto las proteínas de membrana como las de secreción, deben ser previamente destinadas a la membrana del retículo endoplásmico en una conformación que permita su integración (o su translocación al lumen en el caso de las proteínas de secreción).

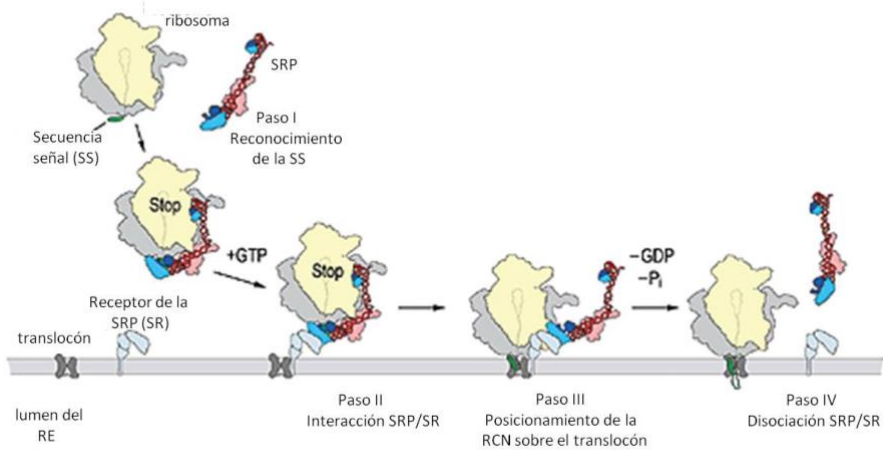
Existen dos mecanismos principales por los cuales las proteínas de membrana y las de secreción llegan a la bicapa para ser integradas en ella o transportadas al exterior celular. El mecanismo cotraduccional implica la translocación y/o integración de la proteína al mismo tiempo que está siendo sintetizada mientras que el postraduccional dirige la proteína a la membrana una vez su síntesis ya ha concluido.

### **12.A. MECANISMO DE INSERCIÓN/TRANSLOCACIÓN COTRADUCCIONAL.**

Este mecanismo de translocación se da en todos los tipos celulares, tanto procarionotas como eucarionotas, siendo el predominante en mamíferos. En los

organismos eucariotas la mayoría de los procesos de translocación e integración de proteínas de secreción y de las proteínas de membrana se encuentran acoplados a la síntesis de la proteína. La dirección de estas proteínas a la membrana del retículo endoplásmico comienza cuando una secuencia compuesta por uno o varios residuos con carga positiva seguida de unos 12-20 aminoácidos hidrofóbicos presente en el extremo N terminal del polipéptido, denominada secuencia señal (SS), emerge del ribosoma. En este momento, un factor citosólico llamado partícula de reconocimiento de la señal ó SRP (Walter and Blobel, 1981a, b; Walter et al., 1981) reconoce el péptido señal, se une a él deteniendo momentáneamente la traducción y dirige al complejo ribosoma/cadena nascente (RCN) a la membrana del RE donde el complejo SRP/RCN es reconocido por el receptor de la SRP (SR). Este reconocimiento posiciona al ribosoma sobre la maquinaria de translocación e integración celular o translocón (Halic and Beckmann, 2005; Walter and Lingappa, 1986) (figura 12.A). A continuación se reinicia la traducción en un proceso que requiere la energía obtenida de la hidrólisis de GTP que es utilizada para la disociación de la SRP, lo que reinicia la traducción y promueve la translocación a través de la membrana del RE mediada por el translocón, quedando libre la SRP para un nuevo ciclo de direccionamiento. El núcleo principal del translocón está formado en mamíferos por el heterotr trímero Sec61 (cuya estructura se describirá con detalle en el apartado 13.A).





**Figura 12.A. Ciclo de la SRP.** Cuando la secuencia señal (SS) emerge del ribosoma, la SRP se une a ella deteniendo transitoriamente la traducción. El complejo ribosoma/cadena nascente (RCN) es dirigido por la SRP a la membrana del RE, donde la SRP interacciona con su receptor (SR) y el complejo RCN se posiciona sobre el translocón. En un proceso dependiente de la hidrólisis de GTP por parte tanto de la SRP como de su receptor, la SRP se libera del complejo RCN y queda libre para un nuevo ciclo de direccionamiento, reiniciándose la traducción. La SS es digerida por la peptidasa del péptido señal mientras el proceso de biogénesis continúa. Tomado de (Halic and Beckmann, 2005).

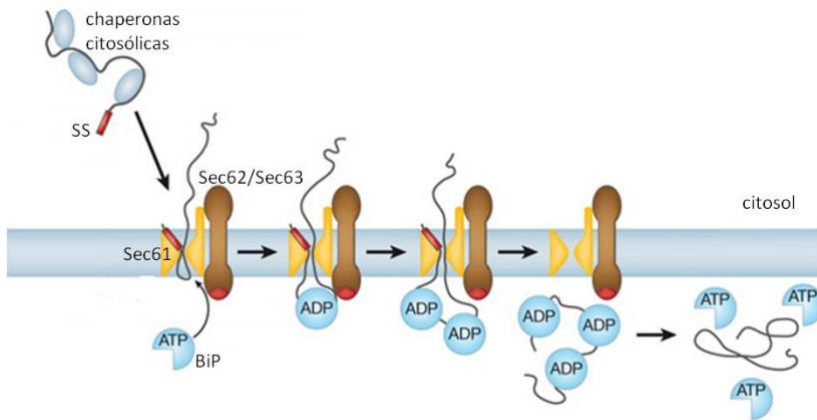
La SRP en eucariotas es una ribonucleoproteína formada por seis subunidades proteicas (SRP 9, SRP 14, SRP 19, SRP 54, SRP 68 y SRP 72) ensambladas junto a una molécula de RNA 7S (Andrews et al., 1985); estos componentes se pueden agrupar en dos dominios. El dominio Alu, que es el responsable de la parada de la traducción cuando la SRP se une a la SS, y el dominio S, cuya función principal es el reconocimiento de la SS. La SRP 54 unida a la hélice 8 del RNA forma el denominado núcleo de la SRP. SRP 54 posee tres dominios: el dominio N, formado por una horquilla de 4 hélices, el dominio G que posee actividad GTPasa y el dominio M, que es el dominio

C terminal rico en metionina. El dominio M es el que tiene capacidad para unir a la SS (Romisch et al., 1990; Zopf et al., 1990), mientras que la interacción con su receptor (SR) mediada por GTP se localiza en los dominios N y G. El dominio NG posee un surco hidrofóbico donde puede acomodar a las secuencias señales hidrofóbicas (Janda et al., 2010; Keenan et al., 2001; Koch et al., 2003).

Una vez el complejo ribosoma/cadena naciente (RCN) ha llegado a la membrana, el túnel de salida del ribosoma queda alineado con el canal del translocón permitiendo la translocación del polipéptido naciente desde el citosol al lumen del RE. En el caso de que el polipéptido que está siendo sintetizado corresponda a una proteína de membrana, los fragmentos TM pueden insertarse lateralmente a la membrana en un mecanismo cotraduccional de translocación/integración ya que el heterotrímero Sec61, como se explicará en páginas sucesivas, tiene la capacidad de abrirse lateralmente para permitir el paso de las secuencias que van a formar parte de la bicapa lipídica. Seguidamente, el péptido señal es eliminado por la peptidasa del péptido señal (proteína asociada al translocón) cuando el polipéptido naciente alcanza una longitud aproximadamente de unos 140 aminoácidos (Mothes et al., 1994). En las proteínas de membrana que no poseen péptido señal el primer segmento TM funciona como secuencia señal de direccionamiento y anclaje a la membrana, por lo que estas secuencias son denominadas comúnmente “secuencias de anclaje”. A diferencia del péptido señal estas secuencias de anclaje no son eliminadas y, en la mayoría de las proteínas politópicas, determinan la orientación del resto de segmentos TM.

## **12.B. LA RUTA POSTRADUCCIONAL DE TRANSLOCACIÓN.**

En esta ruta las proteínas son dirigidas a la membrana una vez finalizada su síntesis. La utilización de esta vía no es muy frecuente en mamíferos, aunque sí es frecuentemente utilizada en organismos más simples como procariotas y levaduras. En la translocación post-traducciona de levaduras y probablemente de todos los eucariotas, el complejo Sec61p (homólogo al heterotrímico Sec61 de mamíferos) se asocia al complejo tetramérico de membrana Sec62/Sec63 y a la chaperona luminal BiP, que es miembro de la familia de ATPasas Hsp70 (Deshaies et al., 1991; Panzner et al., 1995). Mientras el polipéptido se encuentra en el citosol diferentes chaperonas se asocian a él para evitar un plegamiento incorrecto. El direccionamiento de las proteínas recién sintetizadas hasta el translocón se debe a la afinidad de las chaperonas citosólicas por el complejo Sec62/Sec63, que cuando interactúan con él se sueltan de la cadena polipeptídica permitiendo a ésta introducirse en el poro de Sec61. Una vez el polipéptido ha entrado en el canal, la translocación al lumen del RE ocurre gracias a la actividad ATPasa de BiP (Matlack et al., 1999) (figura 12.B1). Cuando BiP una ATP presenta una cavidad hidrofóbica a la que puede unirse a una porción del péptido naciente, con esta conformación interactúa con Sec63 que causa la hidrólisis del ATP y provoca que esta cavidad se cierre sobre el sustrato que está siendo translocado. Cuando el polipéptido se ha translocado lo suficiente otra molécula de BiP puede unirse, y así repetidas veces hasta que el sustrato ha atravesado completamente el canal impidiendo el retroceso de la cadena naciente al citosol (Matlack et al., 1999). Finalmente, el intercambio de ADP por ATP provoca un cambio conformacional que abre las cavidades anteriormente mencionadas y las moléculas de BiP se liberan. Este mecanismo asegura la unidireccionalidad del proceso.



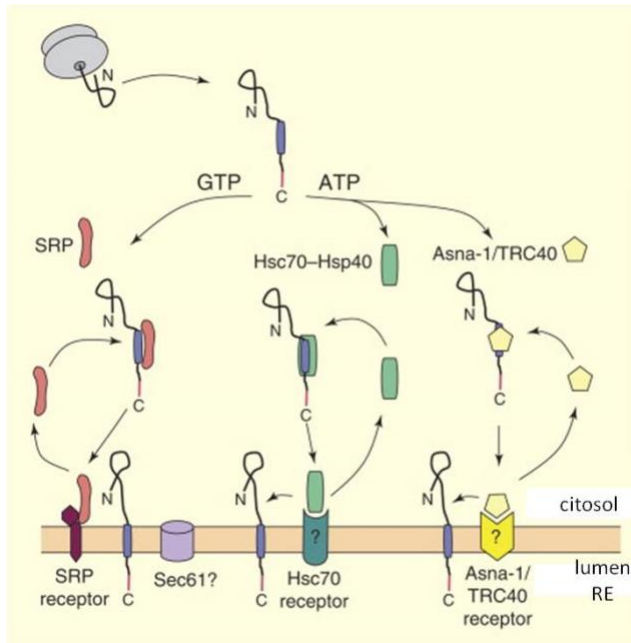
**Figura 12.B1. Modelo de translocación post-traduccionales en eucariotas.** La hidrólisis de ATP mediada por BiP asegura la unidireccionalidad del proceso. Tomado de (Rapoport, 2007).

En bacterias, el polipéptido sintetizado se une en el citosol a la chaperona SecB (Randall et al., 1997). Después la ATPasa citosólica SecA interacciona con SecB para recoger el sustrato que va a ser translocado. La transferencia al canal del translocón requiere la hidrólisis de ATP por parte de SecA, que, una vez deposita el polipéptido dentro del poro, asegura la direccionalidad de la translocación empujando el polipéptido naciente hacia el poro que forma el translocón (Zimmer et al., 2008). Este mecanismo requiere de ciclos de hidrólisis de ATP hasta que la proteína esté totalmente translocada. Las arqueas probablemente también dispongan de un mecanismo de translocación post-traduccionales, pero no se conoce el proceso ya que carecen de SecA, de Sec62/Sec63 y de BiP.

## **Inserción postraduccional en mamíferos: Las proteínas ancladas por el extremo C-t (*tail-anchored proteins*)**

En mamíferos la inserción post-traduccional ocurre casi exclusivamente en las proteínas ancladas a la membrana por su extremo C-t (*tail-anchored proteins*). Se trata de una clase especial de proteínas integrales de membrana que tienen localizado el extremo el N-t en el citosol donde se ubica prácticamente la totalidad de la proteína y que se caracterizan por la presencia de un dominio formado por 18-20 residuos hidrofóbicos en el extremo C-t, lo que implica que su integración deba ocurrir post-traduccionalmente dado que esta región hidrofóbica sólo es expuesta al citosol una vez la cadena nascente se ha liberado del ribosoma. Las proteínas ancladas por el extremo C-t se encuentran en todos los reinos existiendo aproximadamente unas 50 en levadura y unas 300 en el proteoma humano (Beilharz et al., 2003; Kalbfleisch et al., 2007), entre ellas Sec61 $\beta$  y el citocromo b5 han sido las más estudiadas hasta la fecha. Su localización es amplia estando presentes en membranas de mitocondria, cloroplasto, peroxisoma y demás compartimentos intracelulares, pero es en el RE donde se integran previamente para dirigirse después a su destino.

Se han descrito tres rutas por las que una proteína anclada por el extremo C-t es reconocida e integrada en la membrana del RE, una de ellas es dependiente de GTP y las otras dos de ATP (figura 12.B2). La ruta mediada por la SRP es dependiente de GTP y parece ser que la SRP dirige al polipéptido a la membrana y éste se inserta espontáneamente en ella, o al menos, aún no se ha descrito un posible receptor. Las dos rutas dependientes de ATP son las llamadas ruta Hsc70-Hsc40 y ruta Asna-1/TCR40 en las que la inserción esta mediada por la interacción de estos factores citosólicos con su receptor en la membrana del RE (Rabu and High, 2007; Rabu et al., 2009).



**Figura I2.B2. Rutas de integración de las proteínas ancladas por el extremo C-t.**  
 La figura muestra las tres rutas de biogénesis descritas hasta la fecha, dos de ellas son dependientes de ATP y una de ellas de GTP (Rabu and High, 2007).

## I2.C. OTROS SISTEMAS DE TRANSLOCACIÓN/INSERCIÓN.

### Translocación en mitocondrias.

El genoma mitocondrial codifica para un número reducido de proteínas por ello la mayoría de proteínas mitocondriales son importadas post-traduccionalmente. Estas proteínas cuentan con una secuencia señal específica que las dirige a la membrana externa mitocondrial. El transporte a través de las membranas externa e interna se realiza por dos complejos translocasa denominados TOM y TIM respectivamente (Wickner and

Schekman, 2005), los cuales participan también en la integración de las proteínas integrales en dichas membranas.

En la membrana interna mitocondrial existe otra translocasa, Oxa1p, que media la integración de algunas proteínas de la membrana interna que han sido translocadas a la matriz mitocondrial y de proteínas de membrana codificadas por el propio genoma mitocondrial (Hell et al., 1997; Hell et al., 2001; Szyrach et al., 2003).

### **Translocación en cloroplastos.**

De manera equivalente a mitocondrias, la translocación de proteínas a través de las membranas del cloroplasto se realiza de forma post-traducciona, ya que la mayoría de sus proteínas se sintetizan en el citosol. En las membranas externa e interna existen dos complejos proteicos encargados de la translocación denominados TOC y TIC respectivamente.

Para la translocación/integración de polipéptidos en la membrana tilacoidal se han descrito al menos cuatro sistemas: 1) Inserción espontánea mediada por el potencial electroquímico (Mant et al., 1995); 2) en la membrana del tilacoide existe un complejo homólogo al translocón de bacterias implicado en la inserción co-traducciona de las proteínas codificadas en el genoma del cloroplasto y post-traducciona de aquellas proteínas codificadas en el genoma nuclear; 3) la translocasa Alb3 realiza en la membrana tilacoidal un papel equivalente al de Oxa1p en mitocondrias (Woolhead et al., 2001); 4) el complejo TAT es capaz de dirigir la translocación de proteínas ya plegadas al interior de los tilacoides (Robinson and Bolhuis, 2004).

## **Translocación en bacterias.**

En bacterias *Gram-*, además de las rutas ya descritas basadas en SecY (ruta cotraduccional) y SecA/SecB (ruta postraduccional), se han descrito otras rutas alternativas de translocación.

YidC es una proteína asociada a SecY para la que han sido propuestas, al menos, dos funciones: una de ellas es asistir durante la integración en la bicapa lipídica de ciertos segmentos TM, facilitándoles el paso a la membrana (van der Laan et al., 2001); la otra función que se le asigna consiste en una acción propia como translocasa de manera independiente de SecY (de Gier and Luirink, 2003; Serek et al., 2004).

Además, existe otro sistema implicado en la secreción al periplasma de proteínas plegadas, el sistema TAT, análogo al de cloroplastos, el cual reconoce un motivo formado por dos argininas (motivo R-R).

## **13. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL TRANSLOCÓN.**

Se conoce con el nombre de translocón a la maquinaria celular de translocación e inserción en la bicapa lipídica compuesta por un conjunto de proteínas localizado en las membranas del RE. A pesar de que todavía existe cierta controversia acerca de qué componentes son considerados parte del translocón y cuáles no, lo que sí está claramente definido son las proteínas que forman el núcleo del mismo (Gorlich and Rapoport, 1993). El núcleo del translocón está compuesto por el heterotrímero Sec61 en eucariotas cuyo homólogo en bacterias y arqueas se denomina complejo



SecYEG. El heterotrímero está formado por las subunidades Sec61 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  en mamíferos, de las cuales la principal es la subunidad  $\alpha$  (Sec61p en *Saccharomyces cerevisiae* y SecY en bacterias y arqueas, tabla I3) puesto que es ésta la que forma el poro del canal. Esta subunidad posee diez fragmentos TM orientados en una topología N-t/C-t citosólica. La subunidad Sec61 $\beta$  de mamíferos, que contiene un único TM y un extremo N-t citosólico, se llama Sbh1p en *S. cerevisiae*, SecG en bacterias y Sec $\beta$  en arqueas. La subunidad  $\gamma$  de mamíferos, corresponde a Sss1p en *S. cerevisiae* y SecE en bacterias y arqueas; en la mayoría de las especies tiene un único fragmento TM con su N-t orientado hacia el citosol (tabla I3). Las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  del complejo Sec61/SecYEG se encuentran en todos los organismos y muestran una homología de secuencia significativa; sin embargo, las subunidades  $\beta$  son homólogas entre organismos eucariotas y arqueas pero no poseen una obvia homología de secuencia con la SecG bacteriana. En este sentido las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  son esenciales para la viabilidad de levaduras y bacterias, mientras que Sbh1p y Sec61 $\beta$  no lo son.

**Tabla I3. Subunidades del translocón en los distintos organismos.**

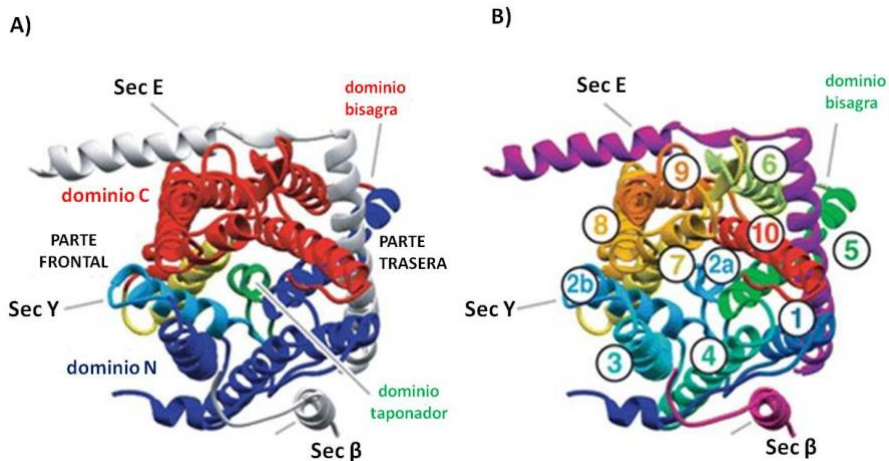
mamíferos	Sec61 $\alpha$	Sec61 $\beta$	Sec61 $\gamma$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sec61p	Sbh1p	Sss1p
eubacterias	SecY	SecG	SecE
arquea	SecY	Sec $\beta$	SecE

### 13.A. ESTRUCTURA DEL TRANSLOCÓN.

La identificación del complejo Sec61/SecYEG como elemento necesario para la translocación tuvo lugar mediante experimentos de reconstitución de proteoliposomas en los que se recuperaba la actividad secretora cuando se añadía el heterotrímero Sec61 purificado a liposomas (Brundage et al., 1990; Gorlich and Rapoport, 1993). Las primeras evidencias que sugirieron de que el complejo Sec61/SecY constituía el canal que conducía a las proteínas a través de la membrana provenían de experimentos de fotoentrecruzamiento. Intermediarios de la translocación, modificados con sondas fotorreactivas en aminoácidos específicos de longitud suficiente como para encontrarse en la membrana, entrecruzaron con Sec61 $\alpha$  (Mothes et al., 1994), indicando que esta subunidad rodeaba a la cadena nascente que estaba siendo translocada.

La topología N-t/C-t citosólica de la subunidad Sec61p de *S. cerevisiae* (homóloga de Sec61 $\alpha$  de mamíferos) se definió en 1996 (Wilkinson et al., 1996) asignándole 10 fragmentos TM y ocho años más tarde van den Berg et al. resolvieron la estructura de rayos X del translocón de la arquea *Methanococcus jannaschii* a una resolución de 3.8 Å (Van den Berg et al., 2004). Los resultados revelaron la existencia de un heterotrímero SecYEG con una estequiometría 1:1:1, siendo SecY la subunidad que forma el canal acuoso del complejo. Este canal posee en la estructura resuelta un diámetro de entre 5 y 8 Å de diámetro. Las diez hélices de SecY se disponen en dos dominios, las hélices que comprenden desde el TM1 hasta el TM5 forman el dominio N y las hélices entre el TM6 y el TM10 constituyen el dominio C. Los dos grupos de hélices poseen una simetría bilateral en el plano de la membrana y están conectados por detrás por un lazo de esta subunidad a modo de bisagra (figura 13.A1). Este lazo y el segmento TM de SecE (subunidad  $\gamma$ ) previenen el contacto de lípidos con el interior acuoso

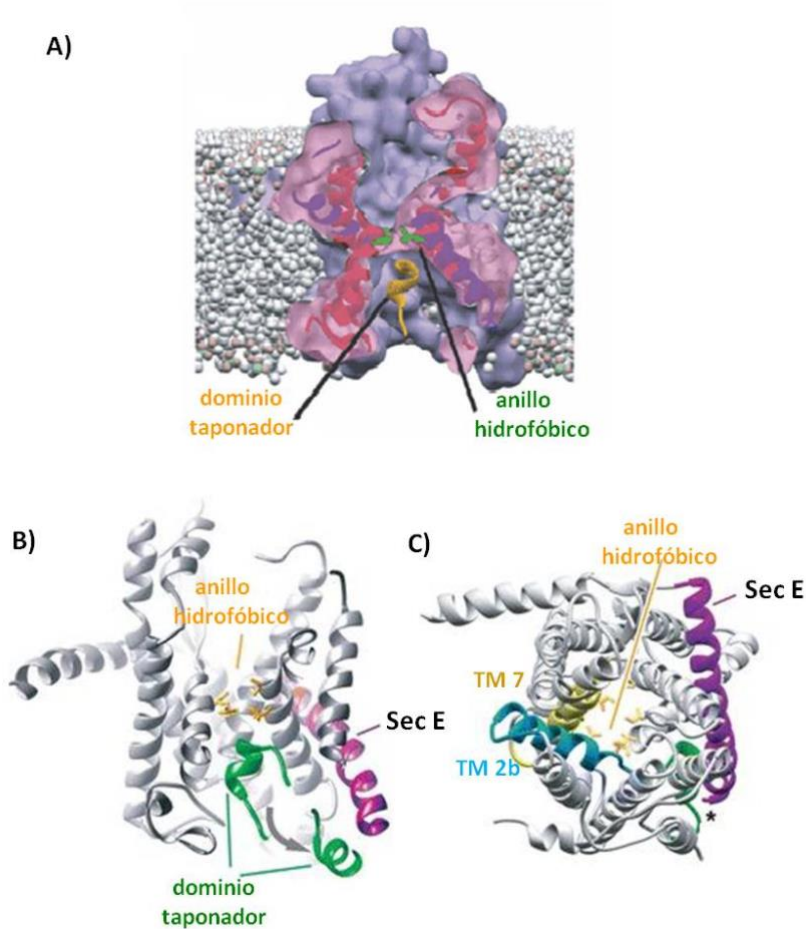
de SecY (subunidad  $\alpha$ ). Es importante resaltar el hecho de que el translocón debe permitir el paso de los polipéptidos en dos direcciones: a través de la membrana para la translocación de los dominios luminales de las proteínas de membrana y las proteínas de secreción y lateralmente para permitir la inserción de los segmentos TM.



**Figura I3.A1. Estructura del complejo SecY de *Methanococcus jannaschii*.** Vista citoplasmática del canal. A) El dominio N-terminal de SecY (TM1-5) se muestra en azul oscuro, con la excepción de TM2b que se representa en azul claro; el dominio C-terminal (TM6-10) se muestra en marrón excepto el TM7 que se representa en amarillo. La secuencia señal se introduciría en medio, entre TM2b y TM7. El dominio taponador del poro formado por TM2a se muestra en color verde. B) Asignación de cada una de las hélices por separado. Tomado de (Osborne et al., 2005).

El único lugar por donde esta estructura es capaz de abrirse para que los fragmentos TM puedan pasar del canal acuoso a la bicapa lipídica es la zona frontal compuesta por las hélices TM2b y TM7 de SecY/Sec61 $\alpha$  que forman una apertura lateral (figura I3.A1). El lazo de la subunidad  $\alpha$  que conecta a los dos conjuntos de hélices se denomina dominio bisagra y se asume que

su cambio de conformación es el responsable de que la puerta lateral se abra y permita acceder a un TM que se encuentre en el interior del translocón a la bicapa lipídica.



**Figura 13.A2. Distintas perspectivas del canal del translocón.** A) Sección perpendicular a la membrana del canal cerrado donde se observa en verde el anillo hidrofóbico y en amarillo la presencia de un dominio taponador (Rapoport et al., 2004). B) Sección perpendicular a la membrana. El movimiento del dominio taponador hacia la subunidad  $\gamma$  (SecE) se indica mediante una flecha gris. Las cadenas laterales de los aminoácidos que forman el poro del anillo hidrofóbico se muestran en amarillo. C) Vista citosólica del translocón en la que se muestra el canal por el que se desplaza la cadena nascente (Osborne et al., 2005).

Esta estructura recuerda a la concha de un bivalvo. El interior del translocón está lleno de agua y, visto desde una perspectiva perpendicular al plano de la membrana, tiene forma de reloj de arena en el que se observan dos compartimentos acuosos (figura I3.A2a), separados por un estrechamiento central o anillo del poro que está constituido por aminoácidos hidrofóbicos que impiden el paso libre de moléculas a su través. Debajo del anillo hidrofóbico hay un dominio estructural formado por una pequeña hélice (TM2a) que actúa como una solapa bloqueando el paso de pequeñas moléculas a través del poro cuando éste se encuentra en una conformación cerrada. En experimentos de dinámica molecular se ha observado que este dominio taponador puede ser desplazado cuando una cadena nascente está atravesando el canal.

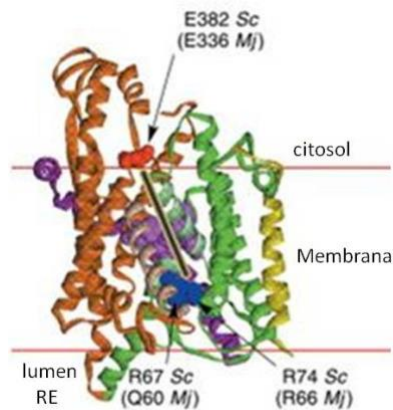
### **I3.B. MECANISMO DE ACCIÓN DEL TRANSLOCÓN.**

A pesar de que pueden existir mecanismos de topogénesis menos canónicos (Pitonzo and Skach, 2006; Tate, 2010), la topología de una gran cantidad de proteínas de membrana se establece durante su paso a través del translocón. La topogénesis suele seguir la regla de “positivo dentro” (*positive inside rule*) de manera que existe un sesgo en la distribución de residuos cargados positivamente en los lazos extramembrana citosólicos respecto a los extracelulares (von Heijne, 1986a, 1989). Así, la región flanqueante del segmento TM que posea una mayor carga neta positiva presentará una mayor probabilidad de quedar orientado hacia el citosol (Hartmann et al., 1989). Además del componente electrostático, otras características como la longitud y la hidrofobicidad de la secuencia señal son importantes en la topogénesis.

La estructura de rayos X de la arquea *Methanococcus janaschii* (Van den Berg et al., 2004) junto a experimentos con mutantes de la subunidad Sec61 $\alpha$  en levadura han permitido proponer un posible mecanismo

mediante el cual en el translocón se pueden orientar las secuencias señales y los segmentos TM de polipéptidos nacientes de acuerdo con la regla de “positivo dentro” (Higy et al., 2004). Residuos negativos en los lazos citosólicos y residuos con carga positiva en los lazos exoplásmicos de Sec61p de *Saccaromyces cerevisiae* (figura I3.B1) pueden interactuar con los aminoácidos flanqueantes de una región hidrofóbica favoreciendo una orientación que se ajuste a la regla de “positivo dentro”. Experimentalmente se ha demostrado que mutaciones de estos residuos cargados a otros con carga opuesta invierten la topología de la secuencia de anclaje en una proteína modelo tipo II (Goder et al., 2004). En la figura I3.B1 se muestra la correspondencia de estos residuos de Sec61p con la estructura de SecY resuelta (Van den Berg et al., 2004). Una observación interesante es que la distancia entre los residuos con carga negativa y positiva es de 33 Å, que es el grosor aproximado de la bicapa lipídica (White and von Heijne, 2004).

Previamente a la adopción de la orientación adecuada según el mecanismo que acabamos de revisar, el canal requiere un desplazamiento del dominio taponador para poder albergar el polipéptido naciente permitiendo su paso. Para ello, se ha sugerido que probablemente el dominio taponador se encuentra en un equilibrio entre una conformación cerrada y otra que permita el paso de moléculas por su interior; este equilibrio se encuentra altamente desplazado hacia la conformación cerrada evitando el paso incontrolado de moléculas de un lado a otro de la membrana, pero el equilibrio puede ser desplazado por una secuencia señal o un segmento TM que entre en el canal. Una vez la secuencia señal (o el primer fragmento TM de una proteína politópica) se ha insertado en la bicapa lipídica, la presencia en el canal del polipéptido naciente que se está sintetizando impide el cierre del dominio taponador.



**Figura 13.B1. Posicionamiento de la secuencia señal en el translocón.** Estructura del translocón de *Methanococcus jannaschii* descrita por van den Berg et al., 2004. La barra negra conecta los residuos ácidos (destacados en naranja) de los lazos citosólicos y los residuos básicos (destacados en azul) de los dominios extracitosólicos de la subunidad  $\alpha$  de *S. cerevisiae* (Sc) y *M. jannaschii* (Mj) implicados en la orientación de las secuencias señales y secuencias de anclaje. (White and von Heijne, 2004).

Durante este proceso, el anillo hidrofóbico que forma la constricción del canal del translocón (figura 13.A2) interacciona con la secuencia que está atravesando el poro y existen evidencias recientes que proponen un papel fundamental de este anillo en el reconocimiento de los segmentos TM y su inserción en la bicapa lipídica (Junné et al., 2010). Además del movimiento del dominio taponador, probablemente se requiera también un ensanchamiento del poro para permitir la translocación de los polipéptidos, ya que el diámetro del anillo hidrofóbico es demasiado pequeño para permitir el paso de polipéptidos incluso en conformación extendida. Globalmente, la apertura del canal debe de producirse por un

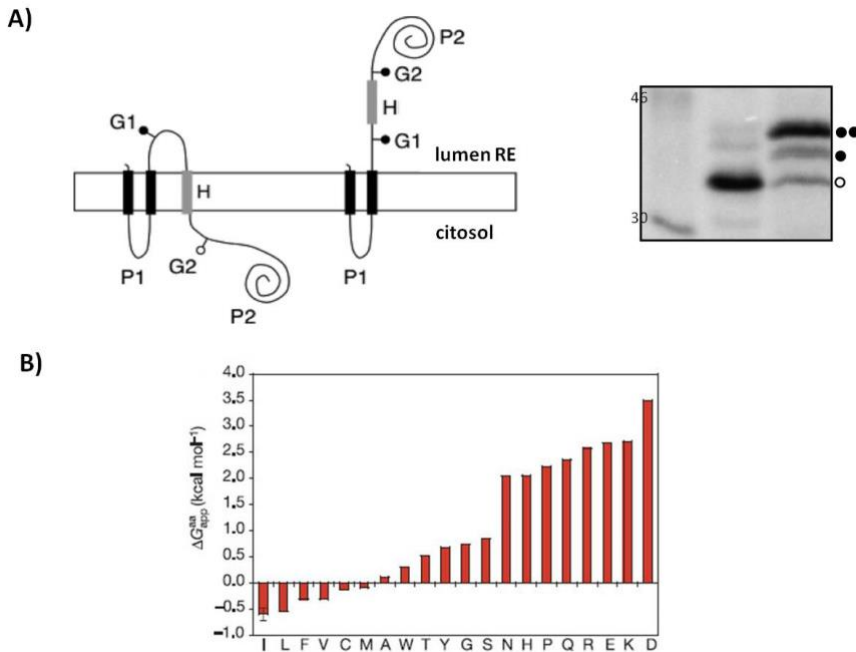
desplazamiento al unísono de las hélices donde residen los aminoácidos que forman el anillo hidrofóbico.

### **Reconocimiento de fragmentos TM y mecanismo de inserción cotraduccional en la membrana.**

¿Cuál es el código que sigue el translocón para determinar qué segmentos del polipéptido que lo está atravesando deben ser insertados en la membrana y cuáles no? Tradicionalmente se ha asumido que la hidrofobicidad de la secuencia polipeptídica es el principal factor que determina la inserción en membranas. En la actualidad existe un elevado número de distintas escalas de hidrofobicidad de aminoácidos de las cuales, una de las que ha tenido una mayor aceptación por ser una de las que mejor se ajusta a los requerimientos de las membranas biológicas es la escala de hidrofobicidad de Wimley-White, determinada experimentalmente mediante la utilización de péptidos sintéticos en ensayos de reparto entre agua y un disolvente orgánico (Wimley and White, 1996). Esta escala incluye la contribución energética no sólo de las cadenas laterales de los aminoácidos sino también del esqueleto polipeptídico en la inserción. Más recientemente se ha propuesto una escala de hidrofobicidad biológica (Hessa et al., 2005a). Esta escala proporciona información relativa a la forma en la que las distintas cadenas laterales afectan al reconocimiento de una hélice transmembrana por el translocón. Además, también se han tenido en cuenta los efectos de la posición relativa de cada cadena lateral en el segmento TM (Hessa et al., 2007) En estos estudios se examinó la integración en membranas derivadas de microsomas de perro de distintos segmentos hidrofóbicos (H) que fueron introducidos dentro del lazo luminal P2 de la proteína de membrana modelo Lep (*leader peptidase*) de *Escherichia coli* y flanqueados por dos dianas de glicosilación modificables por el complejo enzimático oligosacaryltransferasa (OST)



(figura 13.B2a). La OST es un complejo transmembrana asociado al translocón responsable de la incorporación de restos de azúcar a secuencias diana de dominios polipeptídicos translocados al lumen del RE, dado que su centro activo se encuentra en el lumen, como se describirá con mayor detalle en el siguiente apartado. Así, al traducir *in vitro* la quimera la presencia de sólo una glicosilación (que produce un incremento en el peso molecular de aproximadamente 2kDa) es indicativa de inserción, mientras que la presencia de doble glicosilación indica translocación del segmento H objeto de estudio. La mono o doble glicosilación puede observarse mediante retardo en una electroforesis SDS-PAGE. Con este sistema se estudió de forma sistemática la contribución de cada uno de los 20 aminoácidos naturales en la inserción de segmentos hidrofóbicos modelo. Así, se calculó para cada una de las distintas secuencias el incremento de energía libre aparente de inserción ( $\Delta G_{app}$ ) y mediante este sistema se estableció una escala de hidrofobicidad biológica (figura 13.B2b) que se correlaciona sorprendentemente bien con la escala de Wimley-White. Esta similitud parece indicar que la hidrofobicidad es la característica principal que reconoce el translocón para seleccionar los dominios que van a ser integrados en la bicapa lipídica. Probablemente, la estructura del translocón permite, a través del movimiento acoplado de los dos dominios formados por las hélices 1-5 y 6-10, la apertura lateral para facilitar que el fragmento hidrofóbico en cuestión tenga la posibilidad de interactuar con los lípidos que le rodean (Heinrich et al., 2000) y, dependiendo de su hidrofobicidad, se integre en el entorno lipídico de la membrana.



**Figura 13.B2. Reconocimiento de los fragmentos TM por la maquinaria Sec61.**

A) Representación esquemática de la proteína quimérica utilizada para estudiar la integración de diferentes secuencias H con el objetivo de obtener el  $\Delta G_{app}$  de inserción en la membrana para cada uno de los 20 aminoácidos naturales. En la foto del gel SDS-PAGE (derecha) un círculo blanco representa moléculas sin glicosilar mientras que uno negro significa una glicosilación. El fragmento H estudiado en este caso se transloca mayoritariamente como se desprende de la proporción de moléculas doblemente glicosiladas frente a las monoglicosiladas. B) Escala de hidrofobicidad biológica para los aminoácidos naturales mostrados en código de una letra. Los valores negativos indican que el proceso de inserción ocurre de forma espontánea mientras que los valores positivos por encima de 1 kcal/mol denotan la dificultad intrínseca de estos aminoácidos a insertarse en la membrana. Modificado de (Hessa et al., 2005a).

Desde este punto de vista, una de las funciones del translocón es proporcionar un lugar en la membrana en el cual los segmentos TM puedan equilibrarse entre la fase acuosa y la lipídica (Heinrich et al., 2000; von

Heijne, 2006). Así, la inserción de proteínas en la membrana parece ser un proceso termodinámico de reparto mediado por el translocón. Hay que tener en cuenta que la energía libre de inserción para un mismo aminoácido varía dependiendo de la posición en la que se encuentre dentro del segmento hidrofóbico (Hessa et al., 2007). Así no es lo mismo que un aminoácido cargado se encuentre en medio de la región hidrofóbica, donde presenta una penalización energética significativa, que en uno de sus extremos próximo a la interfase ya que en esta segunda ubicación la cadena lateral de estos aminoácidos puede orientarse hacia la región más polar de la interfase reduciendo en gran medida su coste energético de integración.

En este proceso, un mayor grado de complejidad surge en la integración de las proteínas politépicas. Estas proteínas poseen varios segmentos TM que se van sucediendo en el canal del translocón. Muchas de estas proteínas contienen fragmentos TM con  $\Delta G_{app}$  positivos, lo que indica que su integración en la bicapa resulta un proceso termodinámicamente no espontáneo, por lo que se ha propuesto que estos segmentos requieren el establecimiento de interacciones con algunos de los fragmentos TM que les rodean, lo que reduce su polaridad facilitándoles la inserción. En estos casos, los segmentos TM que pueden asistir en la integración de los segmentos “marginalmente” o poco hidrofóbicos no necesariamente se integrarían en la bicapa inmediatamente tras su paso por el canal sino que podrían permanecer en las proximidades del translocón a la espera de que se produzcan estas interacciones para su posterior inserción en bloque en la membrana (Pitonzio et al., 2009; Sadlish et al., 2005).

Recientemente, algunos autores han cuestionado este mecanismo por el cual el translocón permite la integración de los segmentos TM en base a un reparto mediado por un equilibrio termodinámico. Estos autores proponen un mecanismo cinético (Junne et al., 2010; Zhang and Miller, 2010) mediante el cual el translocón se abriría lateralmente dependiendo de la

hidrofobicidad del fragmento que se encuentre en esos momentos en contacto con el anillo hidrofóbico que forma el poro del canal. Así, se ha propuesto que los aminoácidos que constituyen el anillo hidrofóbico crean un ambiente libre de agua, de forma que la elección de los potenciales fragmentos TM no es, realmente, un reparto entre el canal acuoso de Sec61 $\alpha$  y la bicapa, sino más bien entre un ambiente notablemente más apolar que el canal acuoso y la membrana. Este argumento se sostiene en base al estudio de mutaciones de los aminoácidos que forman el anillo hidrofóbico por otros más polares (Junne et al., 2010), en los que se observó que se reduce en un elevado porcentaje la hidrofobicidad requerida para que un segmento pueda integrarse en la bicapa lipídica, sugiriendo que los residuos formadores del anillo son los responsables de ajustar, en última instancia, el umbral de hidrofobicidad para los segmentos TM, lo que implicaría que el reparto se realiza entre una región relativamente hidrofóbica y el ambiente lipídico de la membrana.

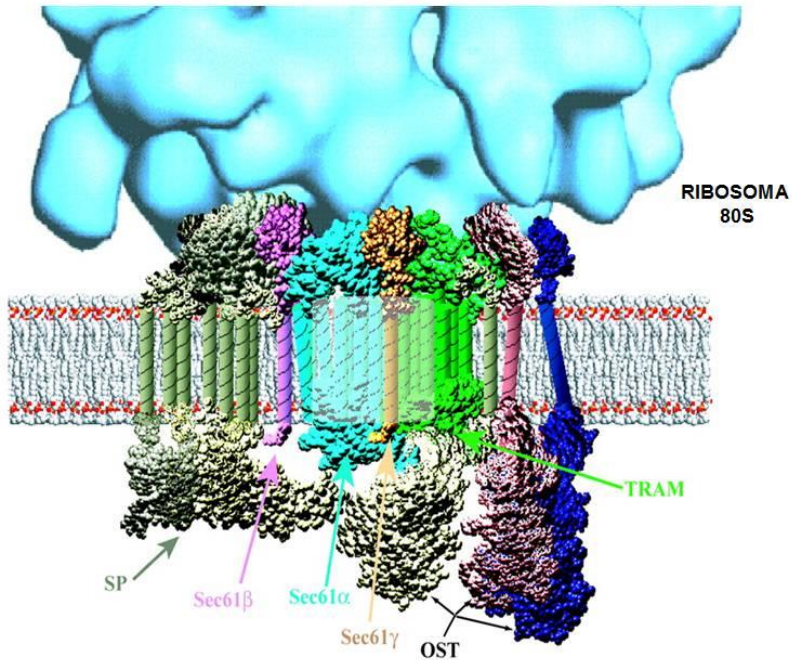
### **13.C. PROTEÍNAS ASOCIADAS AL HETEROTRÍMERO SEC61.**

Además del núcleo central del translocón, formado por el heterotrímero Sec61, en este complejo multiproteico se pueden encontrar otras proteínas asociadas al mismo (figura 13.C1). Entre ellas destacan la péptidasa del péptido señal, la oligosacaryltransferasa (OST), la proteína TRAM (*translocating chain-associating membrane protein*) y TRAP (*translocon associated protein*).

La peptidasa del péptido señal (Paetzel et al., 2002) es una proteasa que se encarga de digerir la secuencia señal (secuencia localizada en el extremo N-t del polipéptido que consiste en varios residuos cargados seguidos de entre 12 y 20 aminoácidos hidrofóbicos) tanto de las proteínas de secreción

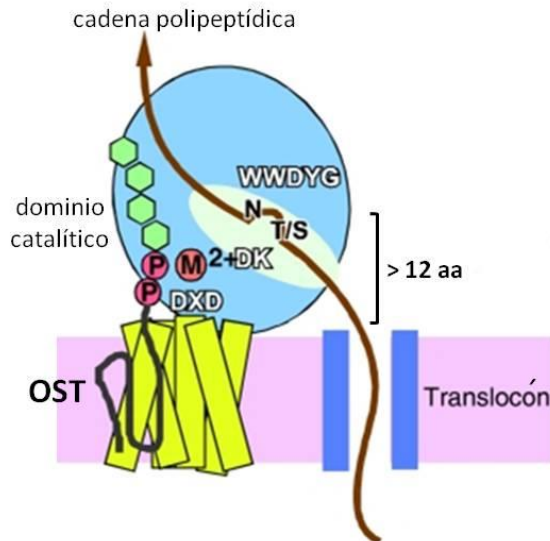
como de las de membrana. Una vez la secuencia señal ha dirigido la cadena naciente a la membrana del RE, es eliminada durante el proceso de translocación a través del translocón. Esta eliminación tiene lugar antes de que la proteína haya adoptado su plegamiento final, probablemente porque su presencia podría alterar la estructura terciaria de la proteína. Este proceso es general para las proteínas de secreción y para las proteínas de membrana en las que la secuencia señal no constituye un segmento TM propio.

El complejo enzimático oligosacariltransferasa (OST) (Nilsson et al., 2003) tiene su centro activo en el lumen del RE. Este complejo reconoce la secuencia consenso NX(S/T), donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, y añade residuos de azúcar (glicosila) al grupo amida- $\beta$  de la asparagina (*N*-glicosilación), incrementando el peso molecular de la proteína en aproximadamente 2kDa que puede ser fácilmente discriminada de la forma no glicosilada mediante una electroforesis SDS-PAGE. El proceso de *N*-glicosilación por la OST es cotraduccional produciéndose al emerger la cadena naciente del translocón, dado que el polipéptido naciente avanza a través del centro catalítico de la enzima (figura I3.C2) (Igura et al., 2008). Es interesante destacar que debido a la disposición del sitio activo de la OST se requiere una longitud mínima de aproximadamente 12 aminoácidos desde el final de la cara luminal de la membrana (final del canal Sec61) hasta la N de la secuencia consenso para que la diana pueda



**Figura I3.C1. Esquema del translocón de mamíferos.** El dibujo representa la subunidad grande del ribosoma eucariota, en azul celeste, posicionado sobre el translocón. Alrededor del heterotrímero Sec61, formado por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , se destaca la presencia de la peptidasa del péptido señal (SP), el complejo enzimático oligosacariltransferasa (OST) y la proteína TRAM. (Johnson and van Waes, 1999).

ser eficientemente modificada (Li et al., 2008; Nilsson and von Heijne, 2000; Orzaez et al., 2004) (figura I3.C2). La distancia mínima de la diana de glicosilación a la membrana varía ligeramente dependiendo de la posición relativa que ocupa la diana respecto de los segmentos TM. Así, debe estar por lo menos a 14 aminoácidos de distancia si se encuentra en posición N-t del segmento TM o a 12 residuos si se encuentra en posición C-t (Monne et al., 1998; Nilsson and von Heijne, 1993; Stefansson et al., 2004).



**Figura 13.C2. Esquema de la subunidad catalítica de la OST.** El esquema representa la subunidad STT3 del complejo OST, que es la subunidad que posee el centro activo. La cadena nascente (línea marrón) emerge del canal del translocón (azul) y se introduce en el dominio catalítico de la OST (azul celeste). La enzima presenta un surco hidrofóbico (blanco) dentro de su dominio catalítico donde los residuos de azúcar (hexágonos verdes) son transferidos a la asparagina de la diana de glicosilación. Se muestran los aminoácidos clave del centro activo de la enzima que se encuentran conservados. Modificado de (Igura et al., 2008).

TRAM es una proteína integral de membrana que participa en los procesos de translocación de proteínas de secreción, siendo imprescindible para algunas de ellas y aumentando la eficiencia en otros casos (Gorlich et al., 1992; Voigt et al., 1996). Además, participa en estadios tempranos de la integración cotraduccional de algunas proteínas de membrana interactuando con las secuencias señal (High et al., 1993; Mothes et al., 1994). A parte de ubicarse en las proximidades de las secuencias señales,

también se ha descrito su presencia en las inmediaciones de fragmentos TM de algunas proteínas durante su integración en la bicapa lipídica (Do et al., 1996; Heinrich et al., 2000; McCormick et al., 2003; Saksena et al., 2004; Sauri et al., 2007; Sauri et al., 2005). Existen datos de entrecruzamiento de TRAM con fragmentos TM poco hidrofóbicos e incluso con residuos cargados (Cross and High, 2009; Heinrich et al., 2000; Meacock et al., 2002), por lo que en los últimos años se ha propuesto un posible papel de “chaperona” de proteínas de membrana. Con esta función, TRAM proporcionaría a las cadenas nacientes de proteínas con segmentos TM poco hidrofóbicos un ambiente intermedio entre el canal acuoso del poro de Sec61 $\alpha$  y el entorno lipídico de la membrana. TRAM podría facilitar así la transición desde la maquinaria de translocación hasta la bicapa de estos TM “marginamente hidrofóbicos”.

Otro componente del RE asociado al translocón es el complejo tetramérico TRAP, compuesto de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (Hartmann et al., 1993) y que resulta ser esencial para la unión de ciertas secuencias señales al translocón, facilitando el inicio del proceso de translocación vectorial al lumen del RE de determinados sustratos, como por ejemplo la proteína del prión, PrP (Fons et al., 2003).

### **13.D. ESTEQUIOMETRÍA DEL TRANSLOCÓN.**

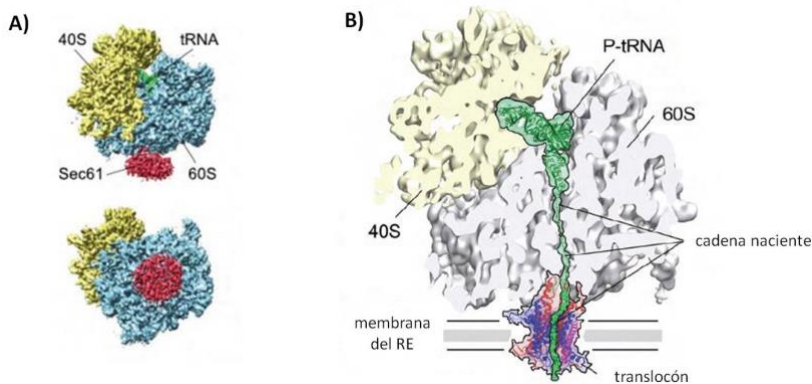
Hasta que en 2004 se resolviera la estructura del translocón de la arquea *Methanococcus jannaschii* (Van den Berg et al., 2004), el mecanismo por el cual el heterotrímero era capaz de permitir el paso de polipéptidos a través de la membrana y la integración de los segmentos hidrofóbicos en la misma era un fenómeno cuyos detalles resultaban intrigantes, puesto que debía permitir el paso de moléculas en dos direcciones del espacio, perpendicular



y lateral. Los primeros estudios de microscopía electrónica que abordaron la estequiometría del translocón sugerían que tanto en eucariotas como en procariotas el complejo Sec61/SecYEG adquiría una estructura similar en forma de anillo, cuyo tamaño sugería que debía estar formado por múltiples copias del heterotrímero (Beckmann et al., 1997; Beckmann et al., 2001; Hanein et al., 1996; Menetret et al., 2000; Meyer et al., 1999; Morgan et al., 2002). El diámetro de estas estructuras comprendería unos 85-90 Å donde los heterotrímeros se dispondrían en forma de cilindro dejando un conducto acuoso central de diámetro variable. Mediante la utilización de sondas fluorescentes incorporadas a cadenas nascentes de proteínas de secreción y de varios agentes desexcitantes (*quencher*s), se observó que el tamaño del poro del translocón activo tiene un diámetro entre 20 y 60 Å, a través del cual los polipéptidos se translocarían (Hamman et al., 1997). Por otro lado, el paso de los segmentos hidrofóbicos a la membrana durante la integración de una proteína de membrana sería posible gracias a un ensamblaje no simétrico de los monómeros que dejaría aperturas en zonas concretas entre los monómeros en las que los segmentos TM podrían entrar en contacto con los lípidos. Todavía se desconoce cuál puede ser el significado biológico del estado oligomérico pero en su momento se sugirió que podría facilitar la unión del ribosoma y/o generar posibles sitios de reconocimiento para otras proteínas que actúan durante el proceso de translocación, como la peptidasa del péptido señal, TRAM o TRAP.

Posteriormente se describió la estructura a baja resolución del translocón de *E. coli* unido a ribosomas activos en el proceso de traducción de proteínas de membrana (Mitra et al., 2005). Estos autores propusieron, a partir de sus reconstrucciones procedentes de datos de crioelectromicroscopía, que al ribosoma activo podían unirse dos heterotrímeros SecYEG, uno de ellos inactivo (que se ensamblaba en la zona de salida del mRNA y el cual poseía una estructura en forma de cilindro elíptico) y otro activo, el cual se alineaba con el túnel de salida de la

subunidad grande ribosomal y a través del cual se translocaba el polipéptido naciente; este complejo activo presentaba una estructura en forma de cilindro circular ligeramente distinta de la que presentaba el translocón inactivo. Estudios alternativos han apoyado la hipótesis de la existencia de dos translocones, uno activo y otro latente, durante el proceso de translocación en organismos procariontes (Osborne and Rapoport, 2007).



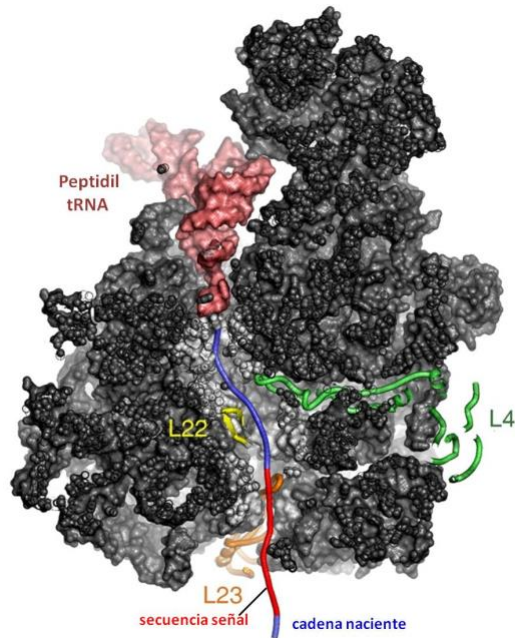
**Figura 13.D. El complejo ribosoma/translocón.** A) Reconstrucción generada a partir de datos de electromicrografía del heterotrímero Sec61 de mamíferos unido al complejo ribosoma/cadena naciente. El panel superior es una vista lateral mientras que el inferior es una vista desde el lumen del RE. La subunidad 40S se muestra en amarillo, la 60S en azul, el complejo tRNA/cadena naciente en verde y el translocón en rojo. B) Representación esquemática del complejo ribosoma/translocón eucariota activo durante los procesos de traducción y translocación de una cadena naciente. Tomado de (Becker et al., 2009).

La tendencia actual, apoyada por el hecho de que un solo monómero de Sec61 puede resolver tanto el paso de polipéptidos a través de la bicapa lipídica como la integración de fragmentos TM en ella (Van den Berg et al., 2004), propone que el canal activo en eucariotas está constituido por un

solo monómero del heterotrímero Sec61. El artículo más reciente que versa sobre la estequiometría del translocón utiliza crioelectromicroscopía de alta resolución y datos bioquímicos para proponer que el heterotrímero activo de mamíferos interactuando con el ribosoma presenta un estado monomérico (figura I3.D) (Becker et al., 2009).

#### **14. PAPEL DEL RIBOSOMA EN LOS PROCESOS DE TRANSLOCACIÓN E INSERCIÓN COTRADUCCIONAL.**

Los ribosomas son complejos ribonucleoproteicos de enormes dimensiones moleculares encargados de la interpretación del código genético y su traducción a proteínas. Están compuestos por dos subunidades de diferente tamaño (60S y 40S en eucariotas, 50S y 30S en procariontes) que se asocian al inicio de la traducción para formar la partícula funcional que se disociará una vez termine el proceso. La subunidad pequeña une el mRNA y proporciona el sitio de decodificación del mensaje, controlando además la fidelidad de la traducción. La subunidad grande contiene el sitio catalítico o peptidiltransferasa (PTC, *peptidyl-transferase center*) así como el túnel de salida del polipéptido naciente (figura I4.1). En el año 2000 se publicó la estructura a elevada resolución (2.4 Å) de la subunidad grande del ribosoma de la arquea *Haloarcula marismortui* (H50S) (Ban et al., 2000; Nissen et al., 2000) y en el 2001 la de la bacteria *Deinococcus radiodurans* (D50S) (Harms et al., 2001)), lo que ha proporcionado una descripción más detallada de la arquitectura del túnel a través del cual viaja la cadena naciente polipeptídica.

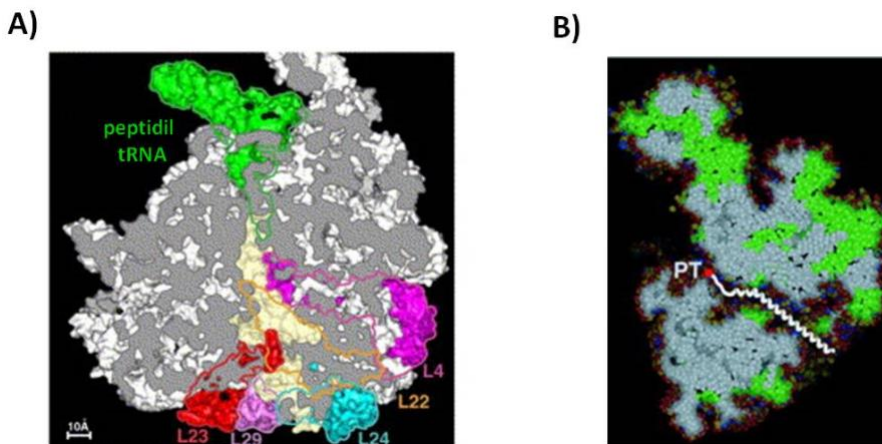


**Figura I4.1. Subunidad grande del ribosoma de *E. coli*.** La cadena polipeptídica naciente (en azul) atraviesa el túnel ribosomal y corresponde a una proteína de membrana con una secuencia señal (en rojo). Se muestran las proteínas ribosomales L4, L22 y L23 que forman parte de las paredes del túnel de salida (Houben et al., 2005).

#### **I4.A. EL TÚNEL DE SALIDA DE LA SUBUNIDAD GRANDE.**

Los polipéptidos nacientes emergen del ribosoma a través de una hoquedad situada a lo largo de la subunidad grande ribosomal. Este canal es una característica universal presente en todos los organismos que ya había sido descrito previamente a baja resolución en los años 80 (Milligan and Unwin, 1986; Yonath et al., 1987). Este túnel conecta el sitio peptidiltransferasa con el exterior del ribosoma en el lado opuesto de la subunidad grande. Su longitud es de aproximadamente 100 Å y, mediante

experimentos de protección del polipéptido naciente frente a la digestión con proteasas realizados con ribosomas de mamíferos, se determinó que en su interior podía albergar entre 35-40 aminoácidos (Blobel and Sabatini, 1970; Malkin and Rich, 1967). El diámetro del túnel oscila entre 20-30 Å en procariontes (se propone que el ribosoma de eucariotas es algo más amplio que el de procarionte ya que presenta surcos y cavidades (Amit et al., 2005; Ban et al., 2000; Harms et al., 2001; Nissen et al., 2000). Las paredes del túnel están compuestas principalmente por RNA ribosomal y el componente proteico es bastante escaso. De entre las pocas proteínas ribosomales que forman parte de la pared del túnel se encuentran L4 y L22 (L22 en arqueas y eubacterias y L17 en eucariotas). Estas proteínas poseen lazos que penetran en el canal y cuyos extremos forman un estrechamiento o constricción en el túnel localizada a unos 20-25 Å del sitio P (figura 14.A).



**Figura 14.A. El túnel de la subunidad grande.** A) Corte longitudinal de la subunidad grande del ribosoma en la que se muestra el túnel de salida conectando el peptidil-tRNA con el exterior y donde se muestran las proteínas ribosomales que tapizan las paredes del túnel (Mitra and Frank, 2006) B) El dibujo refleja un corte longitudinal de la subunidad grande ribosomal donde se ha representado una cadena naciente en conformación  $\alpha$ -helicoidal. Tomado de (Nissen et al., 2000).

El interior del canal es acuoso pero se postula la existencia de núcleos hidrofóbicos formados por regiones concretas de las proteínas ribosomales que tapizan las paredes del túnel (Liao et al., 1997). Estas dimensiones permiten albergar cierto grado de plegamiento en el túnel del ribosoma (figura 14.Ab). Así, se ha sugerido la adquisición cotraduccional de cierto grado de estructura secundaria de las cadenas polipeptídicas nacientes cuando todavía se encuentran en el túnel de salida (Hardesty and Kramer, 2001; Kosolapov et al., 2004; Kowarik et al., 2002; Lu and Deutsch, 2005a; Lu and Deutsch, 2005b; Mingarro et al., 2000; Tu et al., 2007; Tu and Deutsch, 2010; Woolhead et al., 2004).

Actualmente se cree que estos eventos tempranos de plegamiento podrían formar parte de un mecanismo de señalización desde el interior del ribosoma, probablemente mediado por cambios conformacionales en algunas de las proteínas ribosomales mencionadas anteriormente, hacia otros componentes celulares. Así por ejemplo, la estructura de la subunidad grande de la bacteria *Deinococcus radiodurans* (D50S) revela una cavidad de dimensiones considerables en el túnel adyacente a la constricción formada por las proteínas L4 y L22 (Amit et al., 2005). El tamaño de este surco es propicio para acomodar pequeñas regiones de estructura secundaria y por ello se ha propuesto que puede formar un área de nucleación donde las cadenas nacientes inicien la adopción de un plegamiento temprano cotraduccional.

A pesar de que en los estudios estructurales (Ban et al., 2000; Nissen et al., 2000) se describió el túnel como un conducto pasivo e inerte que simplemente conducía a las cadenas nacientes al exterior ribosomal, evidencias bioquímicas posteriores parecen indicar que este canal juega un papel activo en el reconocimiento de la secuencia peptídica que tiene en su interior y es capaz de transducir esta información a otros componentes

celulares (Nakatogawa and Ito, 2002; Walter and Johnson, 1994; White and von Heijne, 2004; Woolhead et al., 2006; Woolhead et al., 2004).

#### **14.B. REGULACIÓN DE LA INSERCIÓN COTRADUCCIONAL DESDE EL INTERIOR DEL RIBOSOMA.**

Desde que en 1997 Do et al. proporcionaron evidencias de que la apertura y cierre de la unión ribosoma-translocón podría estar ligada a la presencia de un fragmento TM en una determinada región del túnel de salida ribosomal, se asume que estos reajustes de la maquinaria de translocación son señalizados desde el interior del ribosoma gracias a su capacidad de identificar el polipéptido que se encuentra en su interior en un momento determinado. Recientemente se han publicado nuevas evidencias de esta capacidad de discriminación y transducción de señales desde el túnel ribosomal hasta elementos del translocón (Berndt et al., 2009; Daniel et al., 2008; Woolhead et al., 2006; Woolhead et al., 2004). La hipótesis más aceptada implica la existencia de un reconocimiento de la secuencia transmembrana del polipéptido naciente por parte de las proteínas ribosomales L4 y L17 (Mitra and Frank, 2006; Woolhead et al., 2004), cuyo cambio conformacional es transmitido hasta la región de la salida del túnel y a la maquinaria de translocación para que se produzcan las reorganizaciones necesarias que requiere la inserción en la bicapa lipídica de una proteína con regiones hidrofóbicas. En este proceso el ribosoma muestra un comportamiento dinámico, sufriendo diferentes cambios conformacionales para adaptarse a las necesidades del polipéptido que está sintetizándose en su interior. Este dinamismo, supuestamente mediado por las proteínas ribosomales L4 y L17, puede manifestarse en una mayor exposición de determinados dominios de otras proteínas ribosomales, como L23 y L35 en mamíferos, ubicadas en la salida del túnel y que

incrementan la afinidad por la SRP y por el translocón (Bacher et al., 1999; Pool, 2009; Pool et al., 2002).

El mecanismo mediante el cual los componentes ribosomales reconocen un segmento TM no se conoce con detalle, pero una de las hipótesis más plausibles implica la formación de cierto grado de estructura secundaria del polipéptido nascente en el interior del túnel. Para ello, se ha postulado que sería necesaria la presencia de una región hidrofóbica que actuara como punto de nucleación para la formación de la hélice alfa en estos segmentos altamente hidrofóbicos que constituirán, finalmente, los segmentos TM (Liao et al., 1997; Woolhead et al., 2004). A pesar de que la estructura de rayos X de la subunidad grande de *H. marismortui* en su estado inactivo nos presenta un túnel acuoso y no revela ningún núcleo significativamente hidrofóbico, la geometría y el diámetro del canal puede variar en los distintos estadios de la traducción, descubriendo temporalmente zonas hidrofóbicas que permitan el plegamiento de los segmentos TM. En este sentido se ha propuesto que un surco descrito en la subunidad grande de la bacteria *D. radiodurans* (ver sección 14.) (Amit et al., 2005) podría proporcionar el espacio, así como el núcleo hidrofóbico, necesario para inducir plegamiento temprano de las cadenas nascentes actuando así como una chaperona “intra-ribosoma” (Yonath, 2005).

Una de las recientes evidencias experimentales que apuntan a que el control de la translocación se lleva a cabo desde dentro del ribosoma se ha realizado en el laboratorio de William R. Skach (Daniel et al., 2008). En este trabajo se describe cómo ciertos segmentos TM de una proteína politópica que acaban de emerger del ribosoma interaccionan de manera diferente con el heterotrímero Sec61 dependiendo de qué secuencia se encuentre en ese momento en el interior del túnel, demostrando que la secuencia y la estructura de la cadena nascente aún estando dentro del túnel tiene un profundo impacto en cómo las regiones TM precedentes son presentadas a



la maquinaria de translocación del RE. Así, la conformación del translocón activo debe estar regulada por cambios conformacionales en el ribosoma inducidos por las cadenas nascentes y por ello, debe ser el ribosoma coordinado con el translocón, y no sólo el translocón como se creía previamente, el que tenga un papel extremadamente relevante en asegurar la correcta orientación del polipéptido nascente (dirigiendo de esta manera la topogénesis) y en determinar si esa región de la proteína debe ser integrada o translocada al lumen del RE (Mittra and Frank, 2006).

## **15. TOPOGÉNESIS Y PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.**

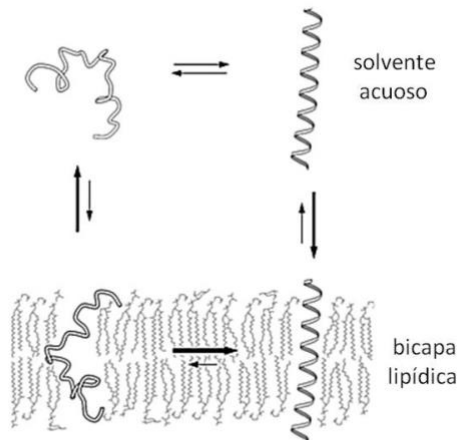
La problemática del plegamiento de una proteína de membrana concierne, al menos, dos aspectos básicos: la adquisición de la topología (es decir, la orientación de los distintos segmentos TM que posee la proteína) y el proceso de plegamiento o ensamblaje para establecer su estructura nativa. ¿Cómo se define la topología de una proteína de membrana durante el proceso de su biogénesis y plegamiento? El modelo de “dos estadios” (Popot and Engelman, 1990; Popot et al., 1987) describe este proceso en dos pasos sucesivos: primero las secuencias hidrofóbicas forman una hélice  $\alpha$  lo que permite su inserción en la membrana y, una vez todas las hélices están insertadas en la membrana tras finalizar la traducción, éstas interaccionan entre ellas ensamblándose para dar lugar a la estructura nativa de la proteína. Este modelo asume que cada uno de los segmentos TM puede insertarse en la membrana secuencialmente, independientemente y de forma estable (figura 15.1). Sin embargo, en muchos casos este modelo es demasiado simple para explicar la topogénesis de proteínas politópicas que presentan una gran

heterogeneidad por lo que respecta a las características de sus segmentos TM. Por ejemplo, existen muchos casos de hélices muy poco hidrofóbicas que no se insertan bien por sí mismas pero que son transmembrana en la proteína plegada (Hedin et al., 2010; Heinrich and Rapoport, 2003; Kauko et al., 2010; Ota et al., 1998a, 2000; Ota et al., 1998b). En estos casos los fragmentos poco hidrofóbicos pueden disponerse de forma extramembranosa durante la biogénesis e integrarse en la membrana al final de la misma, cuando aparece la región de la proteína necesaria para su correcto plegamiento, como en el caso de acuaporina 1 (Pitonzio and Skach, 2006), aunque también existe la posibilidad de que las hélices permanezcan cercanas al translocón hasta que se produzcan interacciones con otros fragmentos que posibiliten su paso a la bicapa lipídica (Pitonzio et al., 2009; Sadlish et al., 2005). Además, ciertos TM pueden interactuar de forma transitoria con proteínas asociadas al translocón como TRAM ó TRAP, que pueden servir como lugares de anclaje o ensamblaje de fragmentos TM antes insertarse finalmente en la bicapa lipídica.

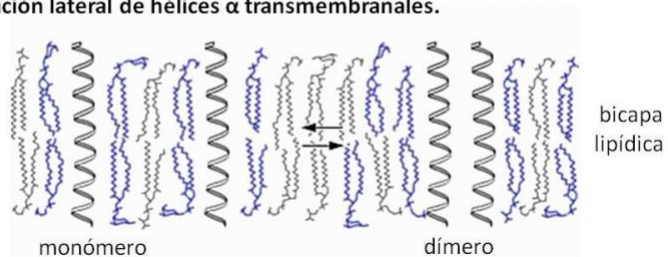
Como se ha expuesto anteriormente, la cadena nascente interactúa con la maquinaria de translocación del RE, lo que determina y facilita tanto la topogénesis como el plegamiento durante su biosíntesis. Cómo y cuando los TM son liberados del canal del translocón parece depender de la proteína en cuestión. El modelo más simple consiste en un reparto rápido entre el canal hidrofílico del translocón y el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica (Heinrich et al., 2000; Martoglio et al., 1995; Rapoport et al., 2004; Van den Berg et al., 2004). Este equilibrio de reparto entre fases está favorecido termodinámicamente por la hidrofobicidad de los segmentos TM (Enquist et al., 2009; Hessa et al., 2005a; Hessa et al., 2007). En contraste con este modelo, la liberación de algunos segmentos TM desde el translocón puede no ser inmediata en la biogénesis de algunas proteínas. Estudios de entrecruzamiento químico y fotoentrecruzamiento han demostrado que una gran variedad de secuencias TM residen en

ubicaciones próximas a Sec61 $\alpha$  durante periodos de tiempo relativamente prolongados, ocupando diferentes ambientes proteicos antes de su completa integración en la membrana (Do et al., 1996; Ismail et al., 2008; McCormick et al., 2003; Meacock et al., 2002; Pitonzo et al., 2009; Sadlish et al., 2005; Sauri et al., 2007; Sauri et al., 2005).

### 1. Los segmentos hidrofóbicos forman hélices $\alpha$ transmembrana estables



### 2. Asociación lateral de hélices $\alpha$ transmembranales.



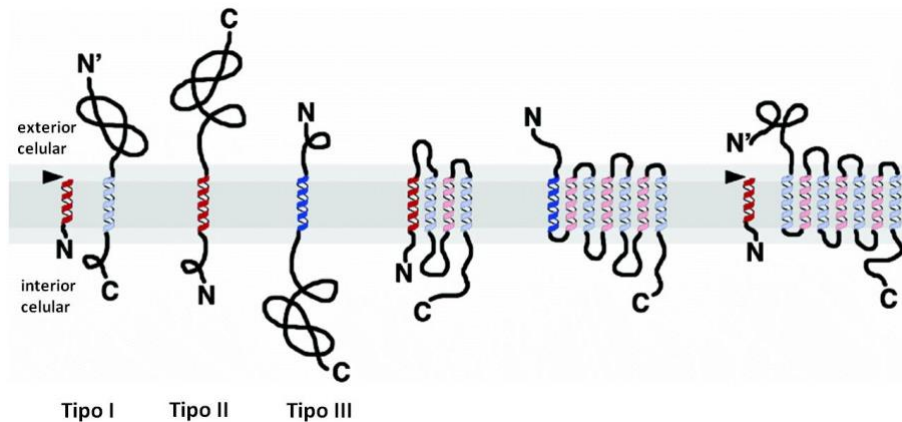
**Figura 15.1. El modelo de dos estados.** El esquema representa el modelo propuesto por Popot y Engelman para el plegamiento de proteínas helicoidales de membrana a principios de los 90. Adaptado de <http://engelmann.csb.yale.edu/index.html>

La biogénesis de las proteínas politópicas requiere una especial atención. ¿Cómo es capaz el complejo ribosoma/translocón de dirigir la topología y plegamiento de una proteína de membrana cuando la cadena nascente presenta varios fragmentos TM conectados por regiones extramembrana pequeñas? En el proceso de integración cotraduccional cada uno de los diversos TM que atraviesan el canal ribosoma/translocón posee determinantes topológicos que actúan como “secuencia de anclaje” (cuando la región hidrofóbica queda orientada con su extremo N-t al citosol y el C-t es translocado) o “parada de translocación” (cuando el N-t es translocado mientras que el C-t queda orientado al citosol) alternativamente. Esta alternancia de orientación podría posibilitar un mecanismo concertado de rápidos movimientos en los que la apertura de la cara luminal del poro del translocón ocurriría de forma concertada al sellado de la unión entre ribosoma y translocón en el lado citosólico y viceversa (relajar la unión entre el ribosoma y el translocón y cerrar la cara luminal del poro formado por Sec61) sucesivamente, a medida que cada uno de los TM sale del ribosoma y penetra en el canal de la maquinaria de inserción/translocación celular. Estas reorganizaciones concertadas permitirían la síntesis de la cadena nascente manteniendo el potencial de membrana y evitando el paso incontrolado de moléculas de un lado a otro de la bicapa lipídica durante este proceso. A pesar de que existen proteínas politópicas que siguen este modelo básico, como por ejemplo acuaporina 4 (Sadlish et al., 2005), este esquema simplista no sirve para explicar el plegamiento e integración de proteínas politópicas que posean TMs “atípicos”, es decir, que sean poco hidrofóbicos, que posean residuos cargados, que la longitud del segmento sea más corta de lo habitual o que simplemente requieran interaccionar con otras regiones de la proteína para su integración coordinada como dominios de inserción. Estos casos no pueden explicarse simplemente mediante el modelo en el que cada TM se integra en la membrana en su orientación correcta de forma independiente del resto del polipéptido. Así, deben existir mecanismos alternativos,

probablemente en los que participe el translocón, así como alguna de sus proteínas asociadas (TRAM, TRAP, PAT-10, etc), para permitir el correcto plegamiento e inserción en la membrana de estas regiones de las proteínas durante su biosíntesis (Pitonzo and Skach, 2006).

### 15.A. DETERMINANTES TOPOLÓGICOS.

Como se ha descrito en apartados precedentes, la adquisición de la correcta topología (localización relativa de sus extremos N-t y C-t) de una proteína de membrana es fundamental para poder llevar a cabo su función biológica. Una clasificación de las proteínas de membrana atendiendo a la topología que adoptan se muestra en la figura 15.A. Existen diferentes factores que determinan la topología u orientación de los diferentes TM de una proteína de membrana, entre ellos destacan la presencia de cargas flanqueando los segmentos hidrofóbicos, la hidrofobicidad del TM y el plegamiento de ciertos dominios estructurales.



**Figura 15.A. Clasificación de las proteínas de membrana.** Una hélice roja representa un péptido señal (la flecha superior indica el corte) o una secuencia de anclaje mientras que la hélice azul representa una secuencia de parada de

translocación. Las proteínas de membrana tipo I son aquellas que poseen un péptido señal que genera una topología en la que el N-t está localizado en el exterior celular. Las de tipo II son aquellas que carecen de péptido señal y cuyo primer segmento TM actúa de secuencia de anclaje a la membrana, proporcionando una topología N-t citosólica. Las de tipo III carecen de secuencia señal hidrolizable y en su lugar presentan una secuencia de parada de translocación, originando una topología N-t orientado al exterior. Para las proteínas politópicas existen las mismas posibilidades dependiendo del tipo de señal que las dirija a la membrana. Tomado de (Higy et al., 2004).

### **Aminoácidos cargados flanqueantes: la regla de “positivo dentro”.**

Probablemente el determinante topogénico más contrastado consiste en la presencia de residuos cargados positivamente (Arg y Lys) flanqueando los segmentos TM. Estos residuos positivos presentes en los lazos extramembranosos poseen preferencia por una localización citosólica. A esta preferencia se la ha denominado regla de “lo positivo dentro” (en inglés *positive inside rule*) (von Heijne, 1992). Así, una forma simple de predecir en una primera aproximación la topología de una proteína politópica es identificar los segmentos más hidrofóbicos como putativos TM y computar el número de cargas positivas presentes en los lazos que los conectan. Esta hipótesis se estableció primero para proteínas de origen bacteriano (Andersson and von Heijne, 1994; von Heijne, 1986b) y posteriormente se observó que las proteínas de membrana eucariotas también presentan un sesgo similar (Gafvelin et al., 1997), aunque de manera menos estricta que en procariontes. En bacterias se ha propuesto que este efecto se debe al marcado potencial electroquímico que existe a través de la membrana interna bacteriana, de forma que los aminoácidos de los lazos citosólicos cargados positivamente interaccionan con los lípidos cargados negativamente de la monocapa interna de la membrana (van Klompenburg et al., 1997). En eucariotas este potencial es prácticamente

inexistente y la *positive inside rule* se ha explicado por una interacción de los residuos positivos con cargas negativas de los lazos citosólicos de Sec61 $\alpha$ , mientras que los residuos cargados negativos ubicados en los lazos luminales podrían interaccionar con aminoácidos cargados positivamente situados en la cara luminal de la subunidad  $\alpha$  del translocón (Higy et al., 2004) (ver sección I3.B). En cualquier caso, cabe mencionar que los residuos cargados negativamente no tienen una preferencia tan marcada por los lazos luminales como los positivos por los citosólicos y por ello no son un determinante topológico tan fuerte.

Un reciente estudio del laboratorio del Profesor von Heijne (Seppala et al., 2010) demuestra la importancia de la *positive inside rule* describiendo una proteína politópica (con 5 fragmentos TM) cuya topología puede ser controlada simplemente introduciendo un único residuo de arginina o lisina. En este estudio se ha demostrado que una vez traducidas las cuatro primeras hélices TM, la adición de un solo residuo cargado positivamente invierte la topología de la proteína, lo que aporta como conclusión el hecho de que la cadena nascente pueda permanecer asociada al translocón con una topología no definida que permita su inversión en la membrana.

### **Hidrofobicidad del dominio transmembrana.**

Existen evidencias experimentales que muestran que fragmentos TM altamente hidrofóbicos orientan mayoritariamente su extremo N-t hacia el lumen (tipo I) mientras que aquellos con una hidrofobicidad más moderada lo hacen hacia el citosol (tipo II) (Goder and Spiess, 2001). Para explicar este fenómeno se propuso que la apertura lateral del translocón permitiría la inserción rápida en la bicapa de los fragmentos TM más hidrofóbicos con una orientación N-t hacia el lumen, mientras que secuencias menos

hidrofóbicas no particionarían con tanta facilidad permaneciendo más tiempo en el canal del translocón permitiendo su inversión topológica (Goder and Spiess, 2001).

### **Plegamiento del extremo N-t.**

Este determinante ha sido descrito únicamente en proteínas que carecen de secuencia señal y por tanto su extremo N-t cuando emerge del ribosoma está expuesto al citosol. Si la región N-t de estas cadenas nacientes adquiere cierto grado de estructura terciaria, este dominio estructurado ya no podrá ser translocado (Denzer et al., 1995), con lo que su topología estará forzada a ser N-t citosólica (proteína tipo II). Las proteínas tipo III con un largo extremo N-t deben, por lo tanto, mantener desplegada su secuencia mediante chaperonas citosólicas para permitir su translocación.

## **15.B. INTERACCIONES IMPLICADAS EN EL PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.**

### **Fuerzas intramoleculares que estabilizan el plegamiento nativo.**

Las interacciones que mayoritariamente estabilizan el plegamiento de las proteínas de membrana son las fuerzas de van der Waals: moléculas que no son polares pueden convertirse temporalmente en dipolos si su densidad electrónica global se distribuye de una forma desigual. Estos dipolos, si se encuentran lo suficientemente cercanos pueden inducir un dipolo temporal en la densidad electrónica de una molécula apolar vecina, permitiéndose así que se cree una interacción entre ellas. Los residuos en los segmentos que se encuentran embebidos en la membrana suelen estar más cercanos entre ellos que en las proteínas solubles o porciones extramembranasas,



dado que al excluirse preferentemente el agua de solvatación se permite que se cree un alto número de interacciones de van der Waals que estabilizan su estructura dentro de la bicapa.

La segunda fuerza mayoritaria que estabiliza las hélices en las membranas son los enlaces por puente de hidrógeno. Existen evidencias de que residuos de Asn, Asp, Gln y Glu presentes en fragmentos TM son capaces de establecer puentes de hidrógeno fuertes estabilizando las interacciones entre hélices vecinas o dirigiendo la oligomerización de las mismas (Choma et al., 2000; Gratkowski et al., 2001; Meindl-Beinker et al., 2006; Zhou et al., 2000; Zhou et al., 2001). La intensidad de este tipo de interacciones depende de la distancia entre los grupos aceptores y los donadores por lo que pequeños cambios estructurales pueden fácilmente tener como consecuencia la ruptura de un puente de hidrógeno.

Aunque los aminoácidos cargados (Lys, Arg, His, Asp y Glu) no son muy frecuentes en las hélices transmembrana, interacciones iónicas intramembranas han sido también descritas (Donohue et al., 1999; Hall et al., 1999) contribuyendo en gran medida al conjunto de fuerzas que estabilizan el plegamiento nativo.

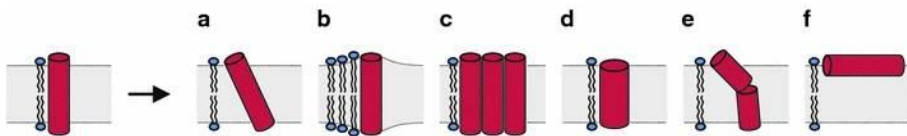
Además de las interacciones descritas, la interacción entre hélices transmembrana puede ser dirigida por residuos aromáticos que suelen estar mayoritariamente representados en las zonas interfaciales de la bicapa (Ridder et al., 2005; Sal-Man et al., 2007), además de por motivos que favorecen el empaquetamiento de hélices mediante fuerzas de van der Waals como por ejemplo las cremalleras de glicina (GxxxG, (G,A,S)xxxGxxxG y GxxxGxxx(G,S,T) (DeGrado et al., 2003).

## Interacciones proteína-lípido.

Finalmente, la composición lipídica de la bicapa afecta a la conformación definitiva que adopta una proteína de membrana. Dependiendo de la estructura de las moléculas de lípido que forman una cierta región de la membrana (cilíndricos o con forma de cono), así como de su estado de carga, se modula la curvatura o presión en la bicapa, por lo que las moléculas proteicas tienen que adaptarse a esta curvatura y ello les afecta en su plegamiento final.

Otro aspecto relacionado con el entorno lipídico y que afecta al plegamiento de las proteínas de membrana es el llamado desajuste hidrofóbico (*hydrophobic mismatch*). Fragmentos proteicos hidrofóbicos de diferente longitud son capaces de insertarse en una misma bicapa, por lo tanto no siempre coincide el grosor de la región hidrofóbica de la membrana con la longitud de las regiones polipeptídicas insertadas en la misma. En estas situaciones regiones hidrofóbicas de la proteína serían expuestas al medio acuoso si el grosor de la membrana es insuficiente para acomodar el segmento hidrofóbico (desajuste positivo) (figura 15.B) o bien residuos polares podrían estar embebidos en la membrana si la región hidrofóbica del polipéptido no es suficientemente larga (desajuste negativo) (Killian, 1998, 2003), por lo que tanto los lípidos como las proteínas tendrán que adaptarse para minimizar la energía del sistema. Los lípidos pueden ajustar el grosor de la bicapa adoptando una disposición más o menos extendida en sus cadenas acílicas. Las proteínas, por su parte, pueden responder a este desajuste promoviendo la interacción entre hélices o alterando la conformación del esqueleto peptídico adoptando estructuras helicoidales más o menos alargadas. En los casos de desajuste positivo las hélices TM también pueden adoptar una disposición inclinada (*tilt*) (figura 15.B), menos perpendicular al plano de la bicapa. En los casos de

desajuste negativo, los residuos polares pueden, dependiendo de su posición, proyectar sus cadenas laterales fuera del núcleo hidrofóbico de la membrana, fenómeno que se conoce como *snorkel* (Monne et al., 1998).



**Figura 15.B. Representación esquemática de las posibles adaptaciones en el caso de que el segmento TM sea más alto que la membrana.** A) Inclinación de la hélice (*tilt*). B) Alargamiento de las colas lipídicas. C) Oligomerización. D) Distorsión del esqueleto polipeptídico. E) Flexión de la hélice. F) Adopción de un estado no transmembranal Tomado de (Holt and Killian, 2010).



# OBJETIVOS

---



El objetivo general de esta tesis es aportar datos nuevos al conocimiento de las etapas tempranas en la biogénesis de las proteínas de membrana. Cómo y cuándo se adquiere el plegamiento y la correcta orientación de los fragmentos TM, así como cuáles son los mecanismos mediante los que ocurre la integración cotraduccional en la bicapa lipídica a través del translocón son objetos intensivos de estudio en el campo de las proteínas de membrana. En el presente trabajo se han abordado los siguientes objetivos concretos:

1. Demostración de la adquisición de estructura secundaria de fragmentos transmembrana en el interior del túnel de salida de la subunidad grande del ribosoma de mamíferos. Identificación de los determinantes que dirigen este plegamiento.
2. Estudio del comportamiento de diferentes secuencias cuando se encuentran en el canal del translocón durante su biogénesis. Interacción con la proteína TRAM (*translocating chain-associating membrane protein*).
3. Descripción del mecanismo de biogénesis seguido por la proteína TRAM y determinación de su topología *in vitro* e *in vivo*. Estudio de los mecanismos de integración en la membrana seguidos por sus fragmentos TM.
4. Estudio funcional del requerimiento de TRAM para la inserción en la membrana del retículo endoplásmico de diferentes proteínas mediante inhibición de la expresión de TRAM por RNA de interferencia en cultivos de células humanas.





# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



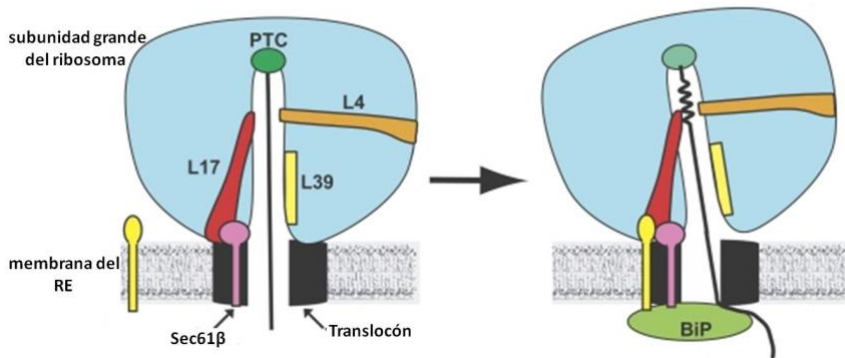
**R1. Plegamiento de fragmentos TM en  
el túnel de salida del ribosoma:  
Determinantes del plegamiento.**

---

## **R1.A. ANTECEDENTES.**

Una vez iniciada la traducción, los estadios tempranos de la biogénesis de todas las proteínas comprenden el avance del polipéptido naciente a través del túnel de salida de la subunidad grande ribosomal a medida que progresa la biosíntesis de la proteína. En contraste con la idea primigenia de que este túnel era un mero conducto pasivo para las secuencias polipeptídicas que acaban de ser sintetizadas, recientemente se ha propuesto que este canal podría tener capacidad para reconocer la secuencia aminoacídica que está siendo sintetizada, pudiendo transducir señales en función de la proteína que se está sintetizando y del entorno celular. Por ejemplo, en el caso de las proteínas de membrana, el ribosoma unido al complejo del translocón en la membrana del retículo endoplásmico podría ser capaz de reconocer los fragmentos TM y señalar esta información a los componentes de la bicapa lipídica con objeto de que se produzcan las reorganizaciones necesarias para la inserción y adquisición de la correcta orientación de las proteínas integrales de membrana. Cómo se producen este reconocimiento y señalización todavía se desconoce, si bien se ha propuesto un modelo en el que estarían implicadas ciertas proteínas ribosomales que forman parte de la pared de este túnel. Una de las hipótesis barajadas es que los fragmentos TM de los polipéptidos nacientes podrían adoptar cierto grado de compactación cuando aún se encuentran dentro del canal, y que esta compactación podría ser detectada por alguna proteína ribosomal produciéndose pequeños cambios conformacionales que serían transmitidos a través del túnel hasta el translocón (Woolhead et al., 2004). Esta adquisición de estructura podría ser pues, específica de fragmentos transmembrana, de esta manera el ribosoma detectaría aquellas proteínas que van a tener la membrana como destino final.

En los últimos años se ha identificado una proteína asociada al RE que podría participar en este proceso de transmisión de la información entre el ribosoma y el translocón durante el proceso de síntesis de una proteína de membrana (Pool, 2009). En este trabajo, se han aportado evidencias experimentales que indican que la proteína ribosomal L17, localizada en la superficie del ribosoma cerca de la salida del túnel, se encuentra adyacente a Sec61 $\beta$  cuando se forma el complejo ribosoma/translocón. Sin embargo, sólo cuando el ribosoma sintetiza una proteína de membrana, L17 además se encuentra adyacente a RAMP4, una pequeña proteína integral de membrana que también se ha descrito asociada al translocón (Schroder et al., 1999). La interacción entre RAMP4 y L17 solamente se visualizó cuando el fragmento TM del polipéptido naciente alcanzaba una zona en la que se observa una constricción dentro del túnel ribosomal, localizada a unos 20-30 Å desde el sitio P (Abell et al., 2002; Ban et al., 2000; Nissen et al., 2000). Estos datos sugieren que el contacto entre un fragmento TM y L17 dentro del túnel puede desencadenar cambios conformacionales que se transmiten haciendo que RAMP4 se asocie al complejo ribosoma/translocón. Un modelo de cómo pueden suceder estos eventos se muestra en la figura R1.A. A pesar del escaso conocimiento que se tiene de los detonantes que pueden iniciar estas reorganizaciones en la membrana, una de las hipótesis más plausibles consiste en que la cadena naciente pueda sufrir cierto grado de plegamiento en estos estadios iniciales de la biosíntesis de proteínas. En este sentido, existen algunos trabajos que sugieren la adquisición de estructuras compactas en cadenas nacientes localizadas en el interior del ribosoma (Hardesty and Kramer, 2001; Kosolapov et al., 2004; Kowarik et al., 2002; Lu and Deutsch, 2005a; Lu and Deutsch, 2005b; Mingarro et al., 2000; Woolhead et al., 2004).



**Figura R1.A. Modelo de control de la estructura del translocón mediado por un fragmento TM que se encuentra dentro del túnel de la subunidad grande ribosomal.** Un fragmento TM adquiere una conformación helicoidal al llegar a la constricción formada por las proteínas ribosomales L4 y L17. RAMP4 (en amarillo) solo interacciona con Sec61 $\beta$  cuando el segmento TM alcanza la zona de la constricción. El entrecruzamiento de L17 con la región TM y con RAMP4 descrito (Pool, 2009), coincidiría en el tiempo con el cierre de la cara luminal del poro del translocón mediado por BiP y la apertura de la unión entre ribosoma y translocón en el lado citosólico, eventos que ocurren cuando la membrana tiene que acomodar a una región citosólica de la proteína. Tomado de (Johnson, 2009).

Un breve resumen histórico de los resultados presentados en estos estudios muestra cómo inicialmente se demostró, utilizando estrategias moleculares de glicosilación, que secuencias artificiales de polileucina y polialanina eran capaces de adquirir cierto grado de compactación dentro del túnel del ribosoma a diferencia de lo que ocurre con segmentos de poliprolina o polivalina (Mingarro et al., 2000). Posteriormente, mediante estudios de FRET (transferencia de energía de fluorescencia por resonancia) se observaron diferencias en los niveles de compactación entre un segmento transmembrana y un segmento del mismo número de aminoácidos perteneciente a una región no estructurada de una proteína de secreción

(Woolhead et al., 2004). Además, otros autores, utilizando una estrategia de marcaje de cisteínas accesibles, han demostrado que ciertos dominios del canal de potasio Kv1.3 podían plegarse en el interior del túnel ribosomal (Kosolapov et al., 2004; Lu and Deutsch, 2005a; Lu and Deutsch, 2005b; Tu et al., 2007; Tu and Deutsch, 2010).

La formación de estructuras compactas previa a la liberación de la cadena nascente tiene importantes implicaciones en los procesos de inserción cotraduccional de proteínas en la membrana. Así, recientemente se ha descrito que la unión de la SRP al ribosoma se estimula cuando se encuentran fragmentos TM dentro del túnel ribosomal (Berndt et al., 2009). Además, se ha demostrado que para que la secuencia señal sea reconocida eficientemente por la SRP debe tener una estructura helicoidal. De esta forma, la adquisición de la estructura secundaria por parte de los péptidos señales o de los fragmentos TM cuando aún se encuentran dentro del túnel del ribosoma podría ser responsable del incremento en la eficiencia de la unión de la SRP al ribosoma para que se produzca un correcto direccionamiento del complejo ribosoma/cadena nascente/SRP a la membrana del RE.

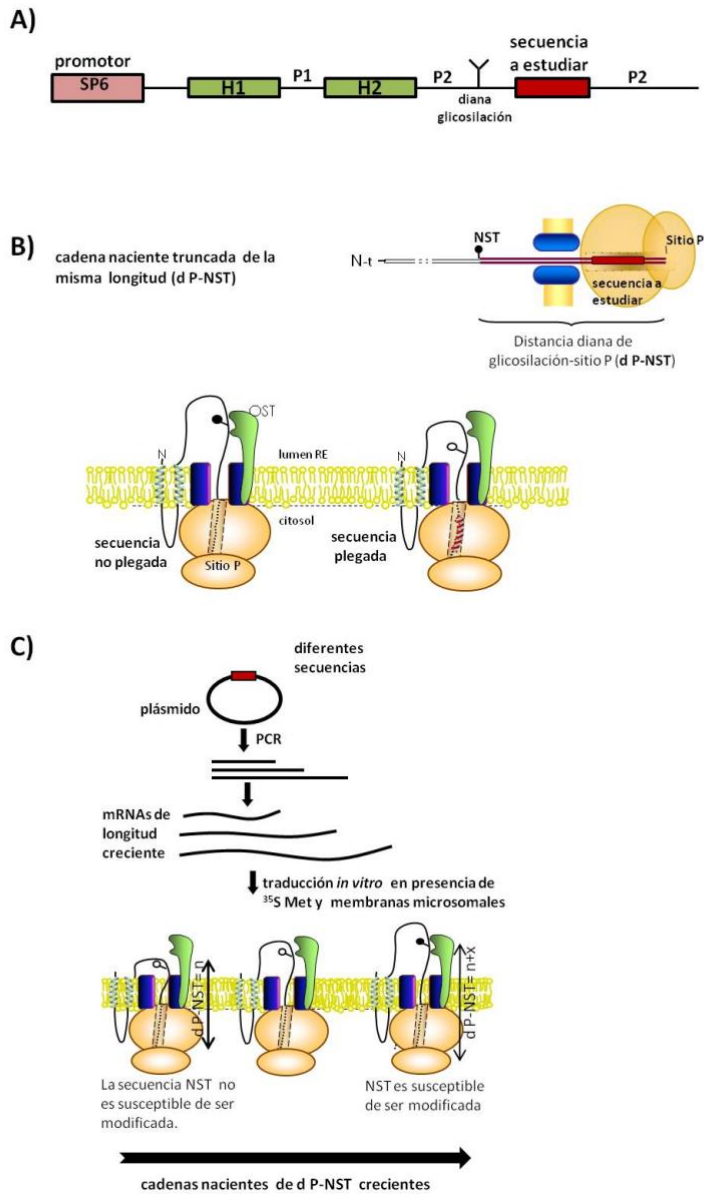
## **R1.B. PLEGAMIENTO DE FRAGMENTOS TM DENTRO DEL TÚNEL DEL RIBOSOMA.**

Nuestro objetivo en esta parte del trabajo es determinar si el plegamiento de cadenas nascentes en el interior del ribosoma es posible, qué diferencias existen entre las distintas secuencias en términos de plegamiento y cuáles son los determinantes moleculares de esta compactación. Para abordar estos objetivos hemos utilizado una estrategia basada en la adición cotraduccional de azúcares (glicosilación) a intermediarios de la biosíntesis de proteínas que se encuentran unidos al sitio P del ribosoma como peptidil-tRNAs (Whitley et al., 1996). Las secuencias estudiadas en el presente trabajo poseen entre 20 y 23 aminoácidos y cada una de ellas fue subclonada en la construcción que se muestra en la figura R1.B1a, basada en la peptidasa del péptido señal Lep (*leader peptidase*) de la membrana interna de *Escherichia coli*. Lep posee dos fragmentos TM (H1 y H2) conectados por un lazo citosólico P1 y un gran dominio C-terminal extracitosólico denominado P2. En este dominio P2 se han introducido las secuencias objeto de estudio, las cuales están precedidas por una diana de glicosilación de la enzima oligosacaryl transferasa (OST). La quimera proteica generada se encuentra bajo el promotor del bacteriófago SP6 de manera que podemos expresar eficientemente la proteína quimérica generando previamente mRNAs *in vitro*. A continuación, se traducen estos mRNAs en presencia de los componentes de la maquinaria de traducción, membranas y aminoácidos marcados radiactivamente para facilitar la detección de la proteína. Al expresar estas proteínas quiméricas en presencia de membranas derivadas del RE (membranas microsomales o microsomas), éstas se dirigirán a las membranas y sus dianas de glicosilación podrán ser modificadas por la OST.

Para conseguir intermediarios de la traducción en los que los polipéptidos objeto de estudio se encuentren dentro del túnel del ribosoma se



generaron, a partir del plásmido descrito, mRNAs truncados (sin codón de parada). La traducción de estos mRNAs truncados da como resultado una cadena nascente que queda anclada al sitio P (peptidiltransferasa, donde se produce la síntesis del enlace peptídico en el ribosoma), ya que la ausencia de codón de parada impide que el ribosoma libere el peptidil-tRNA, originando verdaderos intermediarios del proceso de traducción. Diseñando mRNAs truncados de distinta longitud podemos crear intermediarios de la traducción en distintas fases del proceso de integración cotraduccional, lo que nos permite ubicar las regiones objeto de estudio en distintas posiciones. Dado que un polipéptido nascente requiere una longitud mínima para acceder al centro activo de la OST, aproximadamente unos 65 aminoácidos entre la asparagina diana de la OST y el sitio P del ribosoma (Mingarro et al., 2000; Whitley et al., 1996), parece lógico pensar que el número de aminoácidos necesarios para conectar el sitio P del ribosoma con el centro activo de la OST dependerá de la conformación adoptada por el polipéptido nascente. Así, si una región de la cadena nascente adopta una conformación más compacta dentro del ribosoma, dado que el extremo C-t del peptidil-tRNA está unido covalentemente al sitio P del ribosoma, el extremo N-t, en el que se haya la diana de glicosilación, se retraerá y será menos accesible al centro activo de la OST que si esta región se mantuviera extendida, imposibilitándose la adición de los azúcares. Esta estrategia nos permite utilizar la inserción cotraduccional de proteínas como una 'regla molecular' para cuantificar la tendencia a la compactación que posee una secuencia determinada, midiendo la distancia en número de aminoácidos del polipéptido nascente desde el sitio P (último aminoácido traducido) hasta la asparagina de la diana de glicosilación (d P-NST) (Mingarro et al., 2000).



**Figura R1.B1. La glicosilación como ‘regla molecular’.** A) Esquema de la construcción utilizada. Las secuencias objeto de estudio se introdujeron en el medio del lazo P2 de la proteína Lep (rectángulo rojo, ver texto). B) Para cadenas nacientes truncadas de una misma dP-NST la modificación por la OST será más efectiva en los polipéptidos en conformación extendida que los que presenten

algún grado de compactación (estructura helicoidal). C) Esquema de la síntesis de intermediarios del proceso de integración cotraduccional de polipéptidos nacientes con longitudes crecientes. A medida que la dP-NST aumenta, la diana de glicosilación se va haciendo más susceptible a la modificación por la OST, dando porcentajes de glicosilación más elevados para distancias P-NST menores en secuencias extendidas respecto a aquellas que sufran algún grado de compactación.

En última instancia, estas diferencias en número de aminoácidos se deben a la distinta distancia de traslación de un aminoácido al siguiente entre la conformación extendida ( $\sim 3.3 \text{ \AA}$ ) y cuando el polipéptido está adoptando una estructura helicoidal ( $\sim 1.5 \text{ \AA}$ ). Un esquema de esta estrategia se muestra en la figura R1.B1.

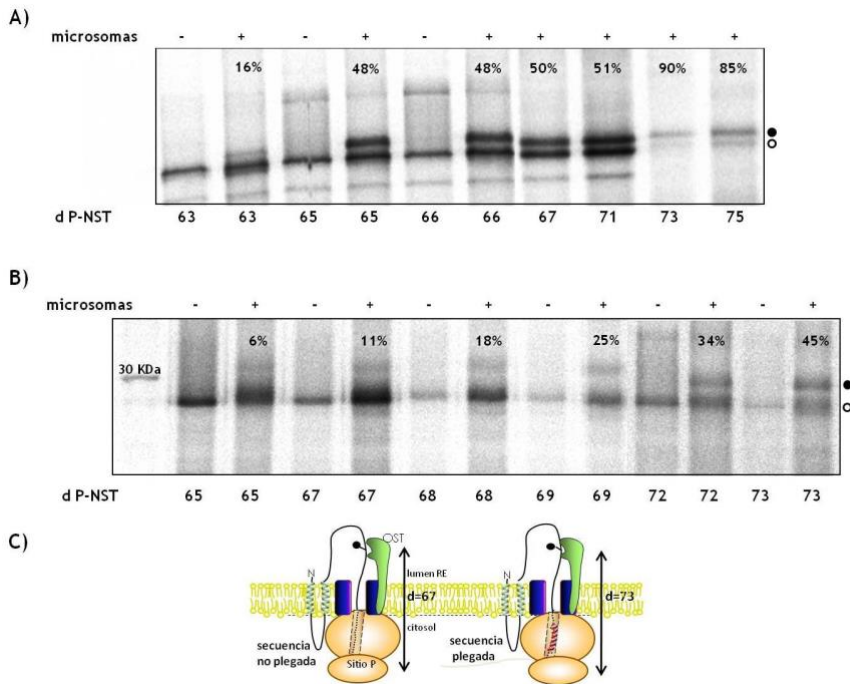
### **Aproximación experimental**

La estrategia molecular utilizada se basa en el incremento en los porcentajes de glicosilación obtenido al aumentar la longitud del polipéptido naciente en experimentos de transcripción/traducción *in vitro*, debido a la aproximación de la diana de glicosilación al centro activo de la OST. Las cadenas nacientes que tengan secuencias extendidas alcanzarán niveles de modificación más elevados a distancias P-NST más cortas que aquellas que posean secuencias que adquieran cierto grado de estructura secundaria, en las que la disminución de la distancia de translación por residuo (de  $\sim 3.3 \text{ \AA}$  a  $1.5 \text{ \AA}$ ) implicará que requieran distancias P-NST mayores para alcanzar niveles de glicosilación similares.

Con objeto de validar esta estrategia experimental se diseñaron dos construcciones que presentan secuencias de aminoácidos, de la misma longitud y con distinta tendencia a la adopción de estructuras secundarias,

ubicadas en la misma posición en la quimera. La traducción *in vitro* de estas secuencias dispone las secuencias objeto de estudio en el túnel de salida del ribosoma. Como control negativo de plegamiento se ha utilizado una secuencia perteneciente al lazo periplásmico del dominio P2 de la proteína Lep. Esta región corresponde a una zona sin estructura secundaria definida en la proteína nativa y se ha demostrado anteriormente que adopta una conformación extendida en este sistema (Mingarro et al., 2000; Whitley et al., 1996). Por otro lado, como control positivo de plegamiento se ha utilizado una secuencia de polileucinas (18 leucinas). Los residuos de leucina tienen una alta tendencia a la adopción de estructuras helicoidales tanto en entornos acuosos como de membrana (Li and Deber, 1994). Además, la adopción de estructuras compactas por estos segmentos de polileucina también ha sido demostrada anteriormente utilizando la misma aproximación molecular (Mingarro et al., 2000; Whitley et al., 1996).

De esta forma, se generaron mRNAs truncados de longitudes (medidas en distancia P-NST) crecientes y se tradujeron *in vitro* en presencia de membranas microsomales y metionina marcada radiactivamente con <sup>35</sup>S. Los productos de la traducción se analizaron mediante una electroforesis SDS-PAGE. El control negativo de plegamiento generó un 50% de moléculas glicosiladas a una d P-NST de 67 aminoácidos, mientras que para el control positivo de plegamiento que contenía la secuencia de polileucinas el mismo porcentaje de glicosilación se obtuvo a distancias superiores a 73 aminoácidos, validando nuestra aproximación experimental y confirmando que probablemente el control negativo se encuentre en una conformación extendida dentro del túnel ribosomal mientras que el segmento de 18 leucinas esté adoptando una estructura helicoidal (Figura R1.B2).



**Figura R1.B2. Controles de plegamiento en nuestro sistema experimental.** A) Autorradiografía de la electroforesis en gel SDS-PAGE de los productos de la traducción *in vitro* de los mRNAs truncados correspondientes al control negativo (lazo periplásmico P2 de Lep) en presencia de  $^{35}\text{S}$ -Met. La ausencia o presencia de membranas microsomales se refleja con signos (-) y (+), respectivamente. El círculo negro indica la presencia de glicosilación mientras que el círculo blanco la ausencia de esta modificación. En cada carrera se muestra el porcentaje de glicosilación. d P-NST es la distancia medida en número de aminoácidos desde el sitio P hasta la asparagina (N) de la diana de glicosilación. B) Niveles de glicosilación para las cadenas nascentes que contienen el control positivo de plegamiento (secuencia de 18 leucinas). C) Representación esquemática de ambos constructos. Se muestra en el esquema el número de aminoácidos entre el sitio P (último aminoácido traducido) y la diana de glicosilación para obtener una eficiencia del 50% de moléculas glicosiladas, lo que depende del grado de compactación del polipéptido nascente.

## **Plegamiento de hélices alfa.**

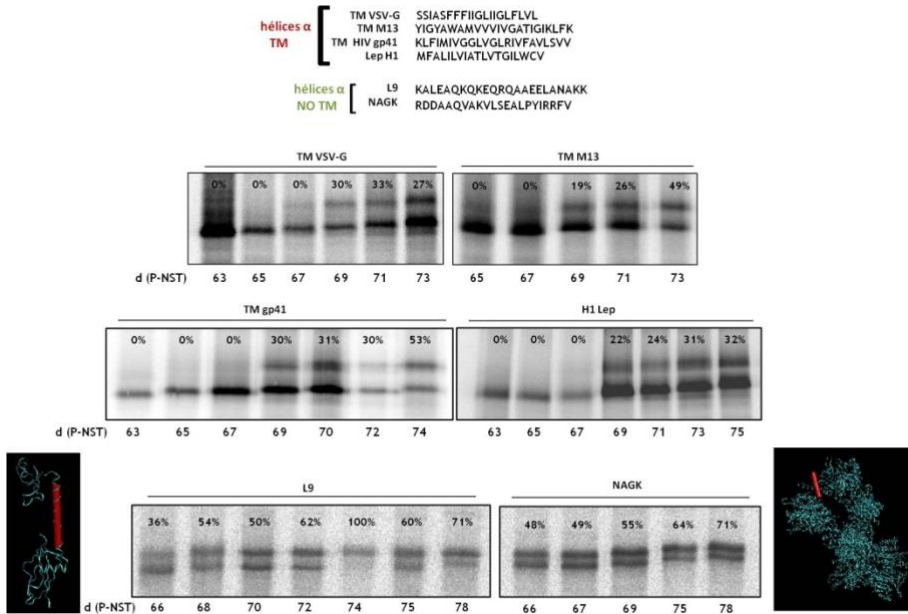
La hélice alfa es el principal motivo de estructura secundaria presente en las proteínas, donde los aminoácidos se disponen formando una hélice generalmente dextrógira que contiene 3.6 aminoácidos y ocupa 5.4 Å por cada vuelta. En esta estructura el grupo N-H del aminoácido  $n$  establece un puente de hidrógeno con el C=O del  $n+4$  y las cadenas laterales están dispuestas hacia el exterior. La hélice está estrechamente empaquetada y la distancia de translación de un aminoácido a otro disminuye hasta 1.5 Å, siendo de 3.3 Å en conformación extendida.

Algunos autores han mostrado evidencias experimentales de que la adquisición de estructura en hélice alfa dentro del ribosoma es posible para cadenas nacientes constituidas por secuencias peptídicas artificiales formadas por polileucinas y polialaninas (Lu and Deutsch, 2005a; Mingarro et al., 2000). Hasta la fecha escasos ejemplos de plegamiento de secuencias naturales han sido descritos; el primero y más revelador fue la observación mediante FRET de la tendencia a la compactación dentro del túnel ribosomal que muestra el fragmento TM de la proteína G de la cubierta lipídica del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Woolhead et al., 2004). Este trabajo hizo que nos cuestionáramos si la potencialidad para adquirir una estructura compacta en las cadenas nacientes es una característica de estaría todas aquellas regiones peptídicas que en su estructura nativa contengan una hélice alfa o si es una propiedad intrínseca de las secuencias transmembranales. La principal característica que comparten la gran mayoría de las proteínas de membrana es la presencia de secuencias altamente hidrofóbicas de unos 20 aminoácidos de sus fragmentos transmembrana. Estas secuencias suelen adquirir una estructura helicoidal ya que de esta manera se reduce la polaridad del esqueleto polipeptídico de la región que atraviesa la membrana debido a que los grupos N-H y C=O están formando puentes de hidrógeno.

Si la compactación dentro del túnel es característica de fragmentos transmembrana, el ribosoma debería ser capaz de proporcionar el entorno adecuado para el plegamiento de fragmentos TM legítimos. En este sentido, a pesar de que el túnel de salida es un canal acuoso (Ban et al., 2000; Nissen et al., 2000), se ha propuesto que en su superficie debe contener regiones no polares que podrían funcionar como núcleos para facilitar el plegamiento de los segmentos hidrofóbicos transmembranales (Liao et al., 1997). Algunas proteínas ribosomales expuestas al canal son candidatas a formar estas zonas de nucleación.

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos dispusimos a estudiar si existen diferencias en el grado de compactación que adquieren secuencias TM y secuencias helicoidales no transmembranales. Para llevar a cabo este estudio elegimos los fragmentos TM de las siguientes proteínas: proteína G de la envuelta lipídica del virus de la estomatitis vesicular (VSV), ya que, como se ha mencionado anteriormente, se había propuesto que podía adquirir cierto tipo de estructura en el túnel de la subunidad grande ribosomal (Woolhead et al., 2004), la proteína mayor de la cubierta del bacteriófago M13, la proteína gp41 de la envuelta lipídica del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el segmento transmembrana H1 de la proteína Lep de *E. coli*. Como secuencias helicoidales no transmembranales elegimos una región de la proteína ribosomal L9 (residuos 45-64) que forma una hélice extraordinariamente estable (Kuhlman et al., 1997) y la región comprendida entre los residuos 5-26 de la proteína NAGK (N-acetilglutamato quinasa) de *Pseudomonas aeruginosa* (Ramon-Maiques et al., 2006) (Figura R1.B3). Estos experimentos fueron repetidos cuatro veces para cada una de las secuencias objeto de estudio y la media de los resultados se muestra en la gráfica de la figura R1.B4. Los datos se han normalizado frente al nivel máximo de glicosilación de cada uno de los constructos, obtenido a partir de la traducción de una proteína (el mRNA

posee codón de parada) que posee 72 residuos desde el último aminoácido traducido hasta la N de la diana de glicosilación.

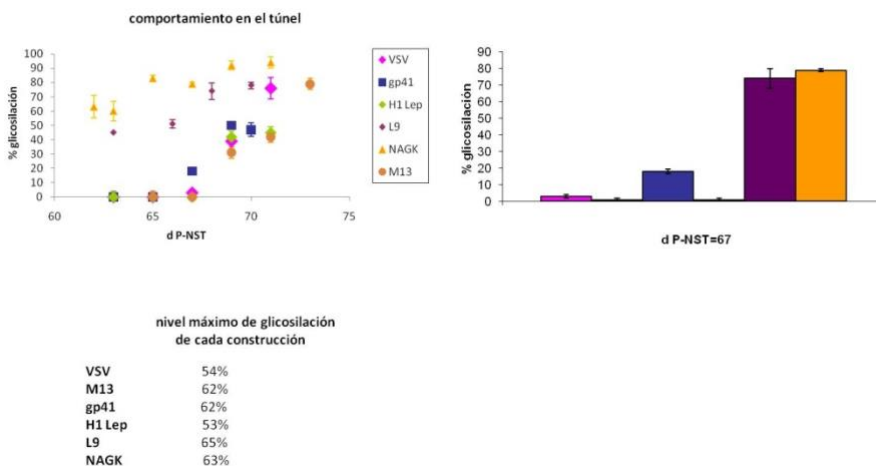


**Figura R1.B3. Plegamiento de diferentes secuencias dentro del túnel ribosomal.**

Experimentos de plegamiento en el túnel ribosomal de cadenas nacientes truncadas. Secuencias objeto de estudio: TM VSV-G (fragmento TM de la glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular), TM proteína mayor de la cubierta del fago M13, TM gp41 (TM de la proteína de fusión del VIH), L9 (región alfa helicoidal de la proteína ribosomal L9) y NAGK (región alfa helicoidal de la proteína NAGK). Se muestran las fotos de las electroforesis SDS-PAGE donde se analizaron los productos de la traducción, en presencia de membranas microsomales y <sup>35</sup>S Met, de los mRNAs truncados de longitud creciente para cada una de las quimeras de Lep con las diferentes secuencias “secuestradas” en el túnel ribosomal.

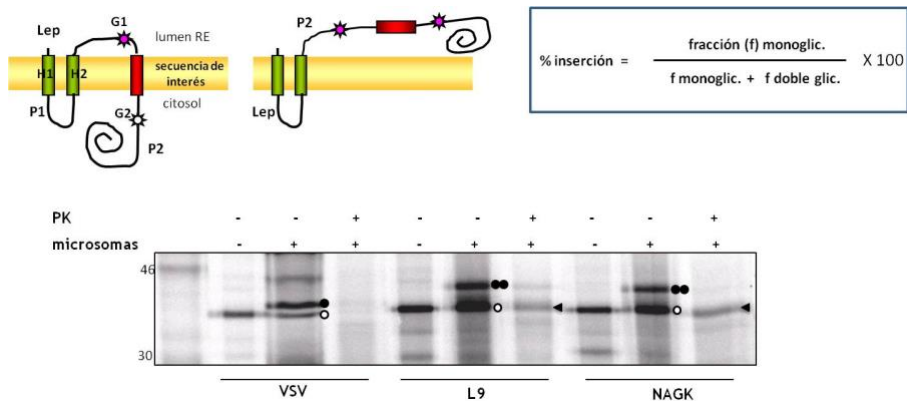


A continuación, para demostrar que realmente las secuencias alfa helicoidales no transmembranales que hemos estudiado no se integran en la membrana, realizamos unas construcciones basadas en la proteína de membrana Lep (Hessa et al., 2005a), que permiten estudiar la capacidad de inserción que posee por sí misma una secuencia foránea en membranas microsomales. En esta construcción las secuencias objeto de estudio se subclonan en medio del lazo extracitosólico P2 de Lep (ver sección I3.B) quedando flanqueadas por dos sitios de glicosilación, G1 y G2 (figura R1.B5).



**Figura R1.B4. Comportamiento de diferentes secuencias dentro del túnel ribosomal.** A la izquierda se muestra una gráfica que representa la distancia desde el sitio peptidiltransferasa hasta la diana de glicosilación de cada cadena nascente frente al porcentaje de glicosilación para cada una de las secuencias “atrapadas” dentro del túnel del ribosoma. A la derecha se ha representado el porcentaje de glicosilación a una d (P-NST) fija de 67 aminoácidos. Los porcentajes de modificación por glicosilación para cada cadena nascente en ambas gráficas están normalizadas frente al nivel máximo de glicosilación que se obtiene al expresar una proteína (el mRNA tiene codón de parada) que posee 72 aminoácidos entre el último aminoácido traducido y la N de la diana de glicosilación, para cada una de las construcciones (panel inferior).

Cuando la proteína quimérica se traduce *in vitro*, se dirige a la membrana y si el segmento a estudiar actúa como secuencia de anclaje a la bicapa, la quimera será modificada solamente en una de sus dos potenciales dianas de glicosilación (G1), ya que el centro activo de la oligosacariltransferasa se encuentra en el lumen del RE, mientras que si la secuencia no es reconocida como transmembrana por el translocón será translocada al lumen del RE modificándose las dos dianas de glicosilación que la flanquean. En estos ensayos, se puede calcular el porcentaje de inserción de una secuencia determinada dividiendo la fracción de moléculas monoglicosiladas entre la suma de la fracción de las moléculas monoglicosiladas + doblemente glicosiladas y multiplicando por cien.

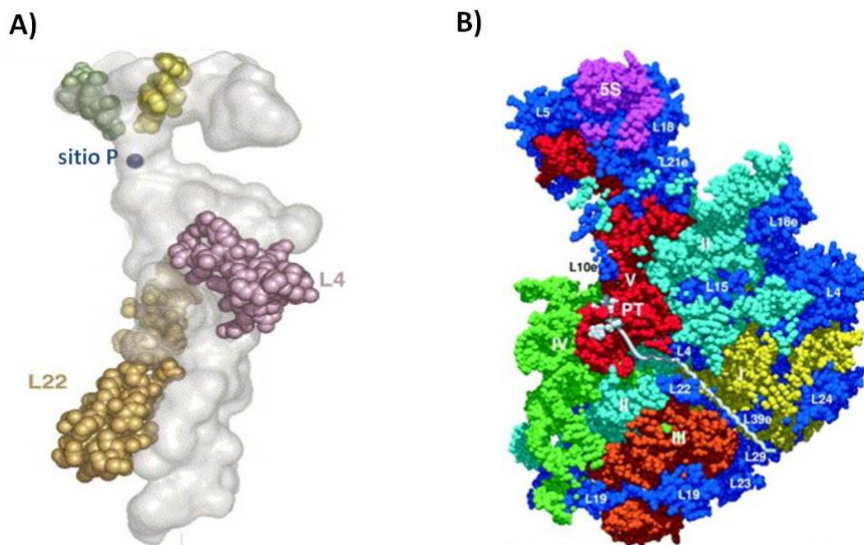


**Figura R1.B5. Estudios de inserción en membrana.** La proteína Lep está formada por dos fragmentos transmembrana, mostrados en verde (H1+H2), un lazo citosólico que los une (P1) y un lazo luminal largo llamado P2. Las dos dianas de glicosilación, G1 y G2, son las estrellas, de color rosa si han sido modificadas por la OST o blancas si no son accesibles a su centro activo. En la fotografía del gel el círculo blanco significa la población de moléculas sin glicosilar, uno negro significa monoglicosilación y dos negros representan la población de moléculas doblemente glicosiladas. La flecha negra es el péptido protegido de la digestión con proteinasa K.

Como observamos en la autorradiografía del gel SDS-PAGE de los productos de traducción que se muestra en la figura R1.B5, el TM de la proteína G del VSV se integra eficientemente en los microsomas (monoglicosilación) mientras que las secuencias helicoidales de L9 y NAGK son totalmente translocadas (doblemente glicosiladas). Para confirmar la orientación de las secuencias se realizaron experimentos de digestión con proteinasa K (PK), que sólo es capaz de degradar aquellas regiones peptídicas que se encuentran accesibles en el exterior de los microsomas (lo que representa el citosol) ya que esta proteasa no es capaz de atravesar la bicapa lipídica, quedando los fragmentos que se encuentren integrados en la membrana o en el interior del lumen protegidos frente a la digestión por la proteasa. Cuando la secuencia introducida dentro del lazo P2 de Lep se inserta en la membrana, el péptido de mayor tamaño molecular que resulta de esta digestión corresponde al segmento H2 más el lazo que conecta con la secuencia TM objeto de estudio y la propia secuencia, y resulta demasiado pequeño para visualizarlo con suficiente resolución en este tipo de geles de electroforesis. Sin embargo, si la secuencia es translocada el péptido protegido resultante contiene H2 de Lep + secuencia objeto de estudio + lazo de P2 entero, que posee aproximadamente un peso molecular de 36kDa, que puede ser visualizado como se señala en la figura R1.B5 con una flecha negra. De estos resultados se deduce que las secuencias derivadas de las hélices no transmembranales tampoco se insertan en la membrana cuando se encuentran en el contexto de nuestra proteína modelo.

Tras analizar los resultados obtenidos podemos decir que los segmentos TM analizados poseen una mayor tendencia al plegamiento o compactación que aquellas secuencias helicoidales que no pertenecen a segmentos transmembranales. Las distancias P-NST a las que se detecta una mayor diferencia entre las secuencias transmembranales y las que no lo son se encuentran entre 63 y 67 aminoácidos. A estas longitudes de cadenas nacientes truncadas las secuencias objeto de estudio se encuentran en el

túnel a una distancia del sitio P de aproximadamente 20-25 Å, precisamente en el lugar en el que está descrita una constricción formada por proteínas ribosomales (Ban et al., 2000; Nissen et al., 2000) (Figura R1.B6) que ha sido propuesta como el lugar donde el ribosoma podría tener capacidad de discernir la naturaleza de la secuencia que viaja a través del túnel (Johnson, 2004, 2009). En este contexto resulta atractivo especular con la idea de que los TM que hemos estudiado adquieran estructura secundaria en el túnel y sean reconocidos por las proteínas ribosomales expuestas al canal (L4 y L17 en eucariotas que son las homólogas a la L4 y L22 en arqueas).



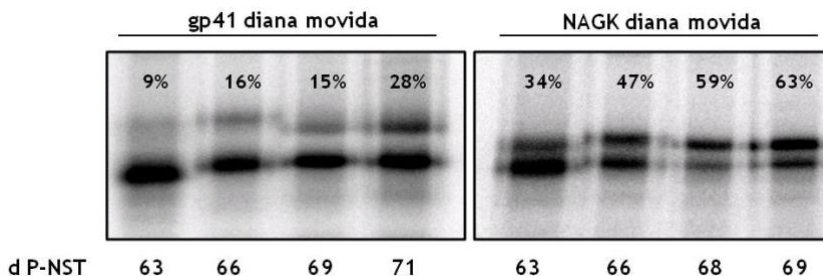
**Figura R1.B6. Constricción en el túnel de salida del ribosoma.** A) Diagrama esquemático del canal de salida de la arquea *Haloarcula marismortui* mostrando las proteínas, L4 y L22, que probablemente interaccionen con la cadena polipeptídica naciente. B) Estructura atómica del túnel de salida del polipéptido naciente de la subunidad grande del ribosoma de *H. marismortui*. La subunidad ha sido cortada por la mitad y el canal se representa a lo largo de la misma. Las proteínas se muestran en azul oscuro (Nissen et al., 2000).

Como hemos visto en la figura R1.B5, aquellas secuencias en las que no se detecta compactación en el túnel tampoco se integran en la membrana mientras que las que se compactan sí lo hacen, por lo que quizá el reconocimiento de secuencias que se pliegan vaya acompañado de una señalización al translocón para facilitar su inserción en la bicapa. Esta hipótesis que proponemos se encuentra en la misma línea que las observaciones de Hamman y colaboradores en los años 90 (Hamman et al., 1998; Liao et al., 1997), en las que se postuló que la unión de la chaperona BiP a la cara luminal de la membrana y la apertura de la unión ribosoma-translocón en el lado citosólico debía ser un proceso coordinado con objeto de evitar el paso inespecífico de moléculas e iones de un lado al otro de la membrana, y que, además, debía ocurrir cuando la secuencia aminoacídica de un fragmento TM se encontraba todavía en el interior, aún dentro del túnel de salida en una posición cercana al sitio P, hecho que indujo a sugerir que el primero en reconocer que el polipéptido nascente es una proteína de membrana es el propio ribosoma. En este contexto, nuestros resultados apoyan la idea de que el ribosoma tiene un papel activo en los procesos de integración en la membrana y topogénesis, discriminando entre aquellas hélices que son transmembranales de las que pertenecen a proteínas solubles gracias a la adquisición de estructura secundaria en el túnel de salida de la subunidad grande.

### **Compactación en otras regiones de la subunidad grande.**

Tras comprobar experimentalmente que los fragmentos TM se plegaban en el interior del túnel de salida ribosomal en una región situada aproximadamente a 20 Å del sitio P quedó una cuestión por dilucidar: ¿este plegamiento o compactación se mantiene a lo largo del túnel? Para contestar a esta pregunta diseñamos una construcción equivalente a la utilizada hasta ahora pero con la diana de glicosilación desplazada 12 aminoácidos hacia el extremo C-t, de manera que para distancias P-NST

comprendidas entre 63 y 71 aminoácidos las secuencias objeto de estudio queden localizadas en los últimos 20Å de la cavidad ribosomal, cerca ya de la salida del túnel. Los resultados de la traducción *in vitro* de intermediarios de traducción conteniendo las secuencias del TM de gp41 y de la región helicoidal de NAGK atrapadas en esta región del ribosoma se pueden visualizar en la figura R1.B7.



**Figura R1.B7.** Las secuencias que se plegan al inicio del túnel mantiene el plegamiento a lo largo de la longitud del mismo. Porcentajes de glicosilación para intermediarios de traducción que contienen las secuencias objeto de estudio localizadas en los últimos 20 Å del túnel ribosomal.

### **R1.C. CARACTERÍSTICAS QUE DETERMINAN EL PLEGAMIENTO DENTRO DEL RIBOSOMA.**

Con objeto de conocer los detalles moleculares del plegamiento en el interior del ribosoma nos propusimos estudiar las que creíamos, podrían ser, características principales que gobiernan la adquisición de estructura secundaria por parte de los segmentos TM en el túnel de salida de la subunidad grande:

1. Hidrofobicidad.
2. Helicidad.

3. Especificidad de residuos.

4. Longitud del TM.

### **R1.C1. La hidrofobicidad y la helicidad son requeridas para la compactación de secuencias cerca del sitio P.**

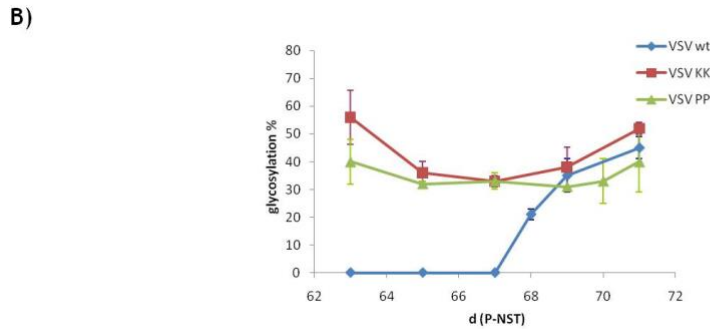
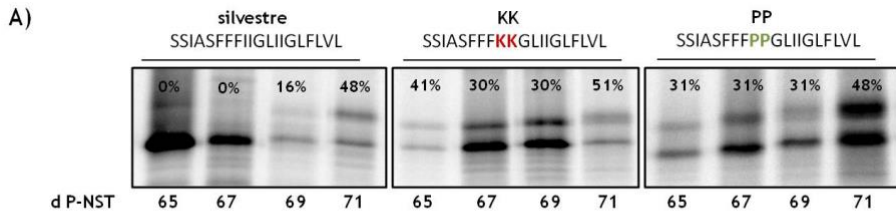
Para realizar estos experimentos nos basamos en la secuencia del TM de la proteína G del VSV, dado que también se ha sugerido su compactación en estructura helicoidal utilizando otra aproximación experimental (Woolhead et al., 2004); sobre esta secuencia realizamos diferentes mutantes los cuales fueron posteriormente ensayados.

Para estudiar si la hidrofobicidad neta del segmento es importante dos isoleucinas localizadas aproximadamente en el medio del TM (I9 e I10) fueron mutadas a dos lisinas, variando así el componente hidrofóbico sin modificar el componente helicoidal, ya que la lisina es un aminoácido con una elevada tendencia a la formación de hélices  $\alpha$ . Para el estudio de la importancia de la helicidad, esas dos isoleucinas fueron mutadas a prolinas por su incapacidad de participar en la formación de los puentes de hidrógeno del esqueleto polipeptídico característicos de la estructura en hélice alfa. La transcripción/traducción *in vitro* de ambas secuencias mutantes aumentaron los niveles de glicosilación respecto a la secuencia del TM original (figura R1.C1), sugiriendo que tanto la hidrofobicidad como la helicidad determinan, en gran medida, la adquisición de una estructura compacta dentro del túnel. La idea de que la hidrofobicidad sea importante hace pensar que probablemente exista una región hidrofóbica en las paredes del túnel que sirva de punto de nucleación para que los segmentos TM comiencen a estructurarse, mientras que el aumento de glicosilación en

los truncados cortos al introducir las prolinas sugiere además que el tipo de estructura que se adquiere es una hélice alfa. A las distancias P-NST a las que hemos realizado estos experimentos las secuencias objeto de estudio se encuentran en la zona donde se localiza la constricción formada por las proteínas L4 y L17 ribosomales, a unos 20-30 Å de distancia del sitio P, lo que vuelve a darnos indicios de que probablemente los fragmentos TM sean reconocidos por el ribosoma en esta zona.

Si la adquisición de estructura secundaria dentro del túnel facilita el proceso de biogénesis de una proteína de membrana, los TM que se pliegan deberían integrarse mejor en la bicapa lipídica. La energía libre de inserción en la membrana para el TM silvestre de la proteína G del VSV que predice el programa *ΔG prediction server* (<http://dgpred.cbr.su.se>) es  $\Delta G_{app} = -1.88$  mientras que para los dos mutantes estudiados tiene valores muy positivos, para VSV-KK  $\Delta G_{app} = 2.36$  y para VSV-PP  $\Delta G_{app} = 2.36$ . El algoritmo utilizado en este programa se basa en datos experimentales de inserción de una batería de secuencias en membranas de RE a través del translocón Sec61, lo que constituyó la primera escala de hidrofobicidad biológica (Hessa et al., 2005a). Los valores negativos de energía libre indican inserción mientras que valores positivos significan que la secuencia no será capaz de integrarse, a mayor valor más penalizada su inserción energéticamente hablando. Según estas predicciones los dos mutantes que no se pliegan en el túnel ribosomal no tienen capacidad para insertarse en la membrana, a diferencia del TM wt que lo hace con elevada eficiencia. A la vista de estos datos nosotros proponemos que el plegamiento en el túnel del ribosoma favorece la inserción cotraduccional de los fragmentos TM a través del translocón.

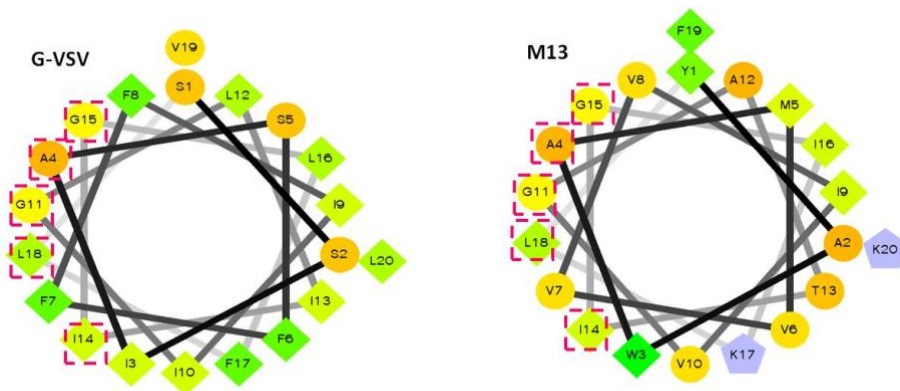




**Figura R1.C1. Efecto de la hidrofobicidad y la helicidad en la compactación dentro del túnel ribosomal.** A) Electroforesis en geles SDS-PAGE de los productos de traducción de mRNAs truncados conteniendo el TM de la proteína G del VSV, así como de sus mutantes KK y PP. Se muestra la longitud de cada cadena naciente y el porcentaje de glicosilación adquirido. B) Representación del porcentaje de glicosilación a medida que aumenta la d P-NST para cada uno de los mutantes. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida en tres experimentos independientes.

## R1.C2. Especificidad de residuos en posiciones concretas.

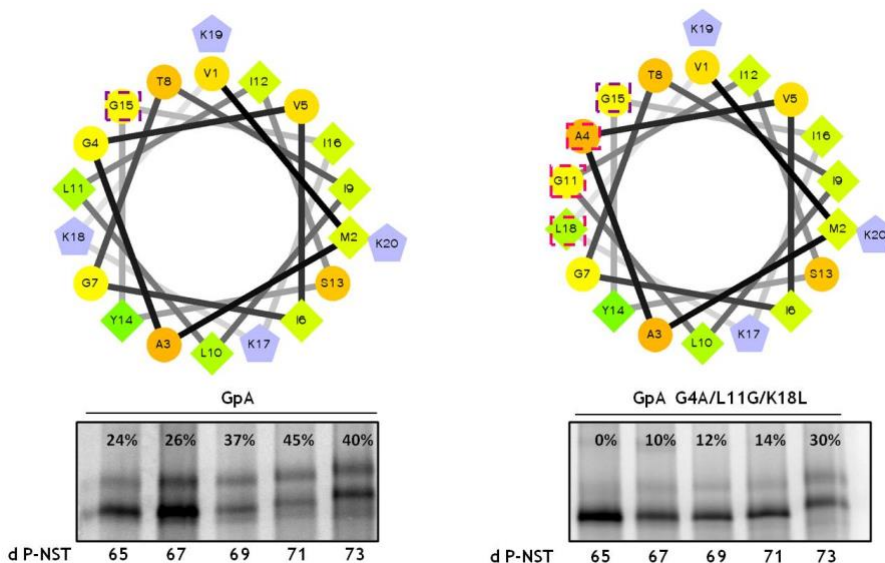
Una vez determinada la importancia tanto de la hidrofobicidad como de la helicidad, nos preguntamos si en los fragmentos que se pliegan en el túnel existe alguna especificidad de residuo, es decir, si existen aminoácidos específicos que favorezcan la compactación. De la comparación directa de la secuencia primaria de los segmentos estudiados no se puede extraer información que corrobore nuestra hipótesis ya que todas aquellas secuencias que se compactan estaban formadas por aminoácidos hidrofóbicos y, *a priori* no se observó ninguna característica diferencial especial. Sin embargo, encontramos un mismo patrón de aminoácidos repartidos en una cara de la hélice al comparar la representación en rueda helicoidal del fragmento TM de la proteína G del VSV con el TM de la proteína de la cubierta del bacteriófago M13 (figura R1.C2).



**Figura R1.C2. Importancia de los aminoácidos presentes en las secuencias que adquieren plegamiento en el túnel.** Representación rueda helicoidal del TM de la proteína G del VSV y de la proteína mayor de la cubierta del bacteriófago M13. Los residuos recuadrados muestran la secuencia consenso encontrada en una de las caras de las putativas hélices alfa.

Observando el patrón, podemos aventurar que quizá la alternancia de aminoácidos voluminosos con otros de pequeño tamaño sea importante para la compactación; esto podría tener una explicación si la secuencia en cuestión interaccionara con alguna proteína de las paredes del túnel que posea un patrón parecido de alternancia entre aminoácidos. Esta hipótesis se refuerza gracias a los datos que hemos obtenido comparando los niveles de glicosilación de truncados de una secuencia que no adquiere compactación en el túnel (Mingarro et al., 2000) con esa misma secuencia a la que, mediante mutagénesis dirigida, intentamos convertir en un segmento que adquiriera compactación. Para ello se sustituyeron ciertos aminoácidos de la secuencia original para conseguir que tuviera una cara de su putativa hélice similar a la secuencia consenso descubierta, como se muestra en la figura R1.C3 (observad que la G15 es propia de la secuencia de glicoforina).

Los datos obtenidos en este apartado indican que existen ciertos aminoácidos que, localizados estratégicamente favorecen la compactación de las secuencias en el túnel. Nuestra hipótesis sobre cuál es la ventaja que aporta la adquisición temprana de plegamiento es que debe favorecer la rápida inserción de las proteínas en la membrana, bien porque el TM ya está “preparado” para particionar a la bicapa lipídica (la formación de puentes de hidrógeno disminuye la polaridad del enlace peptídico y esto disminuye la energía para la integración en el ambiente altamente apolar de la membrana) o bien porque sea un mecanismo de reconocimiento por algún elemento ribosomal que interaccione con la membrana para orquestar el proceso de inserción.



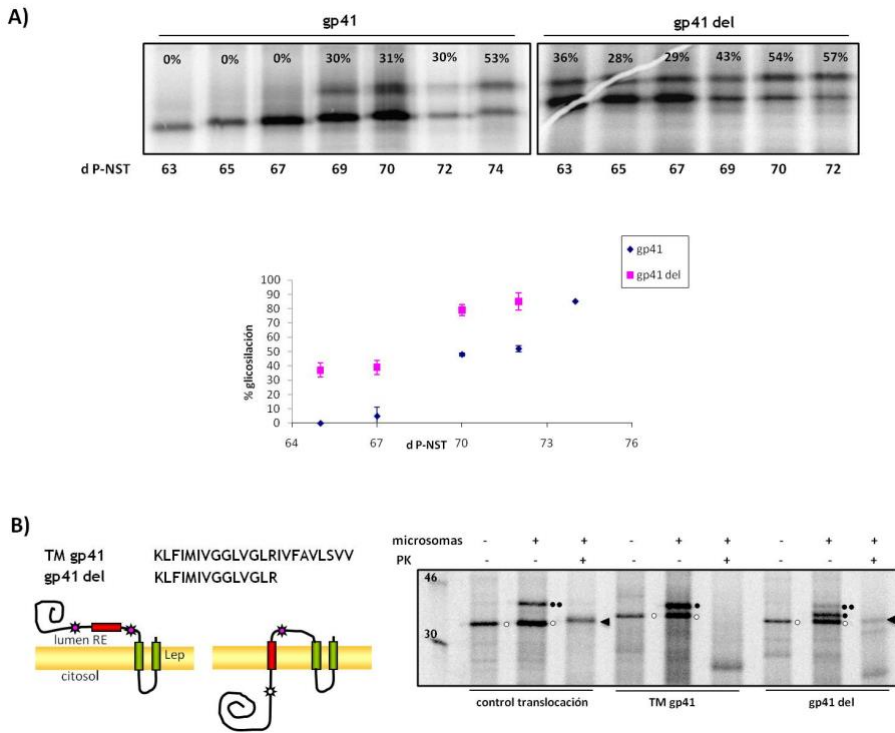
**Figura R1.C3. Conversión de una secuencia que no se pliega en una con tendencia a la compactación.** A) Representaciones en rueda helicoidal del fragmento TM de GpA y del mutante G4A/L11G/K18L, debajo se encuentra el resultado de la traducción de cadenas nacientes que poseen estas secuencias secuestradas en el túnel del ribosoma. B) Gráfica promedio de estos experimentos repetidos tres veces.

**R1.C3. Segmentos hidrofóbicos cortos poseen una menor tendencia a la compactación que TM legítimos.**

Si el ribosoma fuera capaz de distinguir segmentos TM legítimos de cualquier secuencia hidrofóbica que esté siendo sintetizada y este reconocimiento se materializara en la adquisición o no de estructura secundaria en el túnel de salida, cabría esperar diferencias entre los porcentajes de glicosilación de las cadenas nacientes de un TM natural y del mismo TM al que se le ha delecionado una parte importante de su longitud. Para llevar a cabo estos experimentos utilizamos la secuencia TM de la

proteína gp41 del VIH-1, de la que previamente hemos determinado que tiene una alta tendencia a la compactación dentro del ribosoma, y un mutante al que deletamos los 9 últimos residuos del extremo C-t. Los resultados (figura R1.C4a) muestran un comportamiento diferente apuntando a que el mutante de delección efectivamente adquiere una menor compactación en el interior del túnel. Utilizando el sistema de la doble glicosilación en la construcción de Lep, se comprobó que el TM salvaje tenía una mayor capacidad de inserción en la membrana del RE que el mutante de delección (figura R1.C4b), lo que sugiere que, probablemente, el reconocimiento de fragmentos TM legítimos por parte de componentes ribosomales facilite la integración en la bicapa lipídica. Este reconocimiento podría ser consecuencia de la adquisición de estructura secundaria en una región cercana al sitio P.

Nuestros resultados alcanzan un valioso sentido funcional si los integramos con los datos obtenidos por Liao y colaboradores a finales de los 90 (Hamman et al., 1998; Liao et al., 1997), los cuales ofrecían evidencias que apoyaban que el cierre del poro del translocón por la cara luminal mediado por la chaperona BiP ocurría inmediatamente después de que el fragmento TM se hubiera sintetizado, cuando éste se encontraba todavía cercano al sitio P, evidencia experimental que apuntaba a que el ribosoma debía ser capaz de reconocer los segmentos transmembranales por sí mismo, sin que fuera necesaria la participación de componentes de la membrana del RE. Además, cuando solamente estudiaban la mitad de un fragmento TM el cierre del poro luminal no tenía lugar (Liao et al., 1997).



**Figura R1.C4. Influencia de la longitud de la región hidrofóbica.** A) Porcentajes de glicosilación de las cadenas nacientes ancladas al sitio P del TM de gp41 y del mutante al que se le han deletado 9 aminoácidos del extremo C-t. Se muestra la gráfica que representa el porcentaje de glicosilación a medida que aumenta la d P-NST para ambas secuencias; los datos están normalizados frente al nivel de glicosilación máximo que adquiere esta construcción (62%). B) Inserción en la membrana del TM de gp41 y mutante de delección del C-t. Las secuencias fueron subclonadas en el sistema de la doble glicosilación descrito por Hessa et al. (2005). El círculo blanco significa moléculas no glicosiladas, el círculo negro se refiere a moléculas monoglicosiladas, dos círculos negros significa doble glicosilación y la cabeza de flecha son los fragmentos proteicos que han resistido a la digestión por proteinasa K.

Nuestros datos armonizan con estos experimentos presentados más de veinte años atrás, hipotetizando que quizá la señal que dispara la reorganización del translocón sea el plegamiento dentro del túnel y que esta compactación (y consecuente unión de BiP al poro luminal de Sec61 $\alpha$ ) no se da con cualquier región hidrofóbica sino con fragmentos TM legítimos. Esta hipótesis se respalda observando los datos de integración del TM de gp41 y del mutante de delección (figura R1.C4b) que muestran cómo la secuencia hidrofóbica corta del mutante (la cual está desplegada en el túnel de salida) posee un menor porcentaje de inserción en membranas microsomales, lo que probablemente se deba a que la reestructuración de la maquinaria de inserción celular se encuentra funcionalmente comprometida.

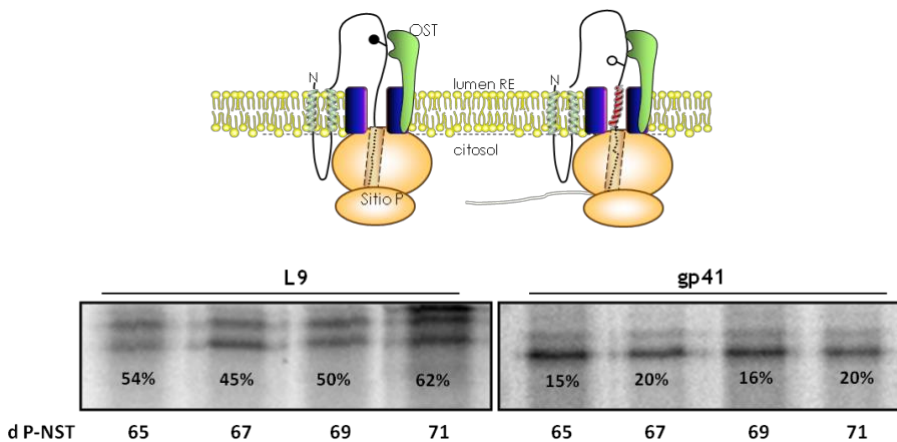
#### **R1.D. PLEGAMIENTO EN EL TRANSLOCÓN.**

Una vez demostrado que las secuencias pertenecientes a hélices transmembranales se compactan en el interior del túnel de salida de la subunidad grande del ribosoma eucariota durante su biosíntesis, nos propusimos estudiar si el plegamiento se mantenía una vez las cadenas nacientes abandonaban el ribosoma para introducirse en el canal acuoso del translocón y si existe algún tipo de interacción entre estos intermediarios de traducción y proteínas asociadas a Sec61.

##### **R1.D1. Plegamiento de cadenas nacientes en el canal del translocón.**

Para alcanzar este objetivo seleccionamos el TM de gp41 y el fragmento helicoidal de la proteína no transmembranal L9. Estas secuencias se subclonaron en una construcción similar a la utilizada para los estudios de

plegamiento dentro del túnel de salida del ribosoma pero con la diana de glicosilación desplazada hacia el C-t con el objetivo de que, para distancias P-NST comprendidas entre 65-75 aminoácidos, las secuencias objeto de estudio queden localizadas en el interior de Sec61 $\alpha$ . Los resultados se muestran en la figura R1.D1. Los niveles de glicosilación para las cadenas nacientes que contienen la secuencia de L9 dentro del translocón son significativamente más elevados que en el caso de gp41, así que, según estos resultados, el transmembrana de gp41 parece que continúa plegado en el translocón mientras que la región de L9 permanece extendida. Estos datos indican que las secuencias que adquieren compactación en el ribosoma mantienen el plegamiento cuando viajan a través del translocón, facilitándose probablemente así su inserción en la membrana.



**Figura R1.D1. Plegamiento en el canal del translocón.** Porcentajes de glicosilación de cadenas nacientes ancladas al sitio P del ribosoma en las que las secuencias objeto de estudio se encuentran localizadas dentro del canal del translocón. Se muestran resultados de una secuencia helicoidal de la proteína L9 y del TM de gp41.

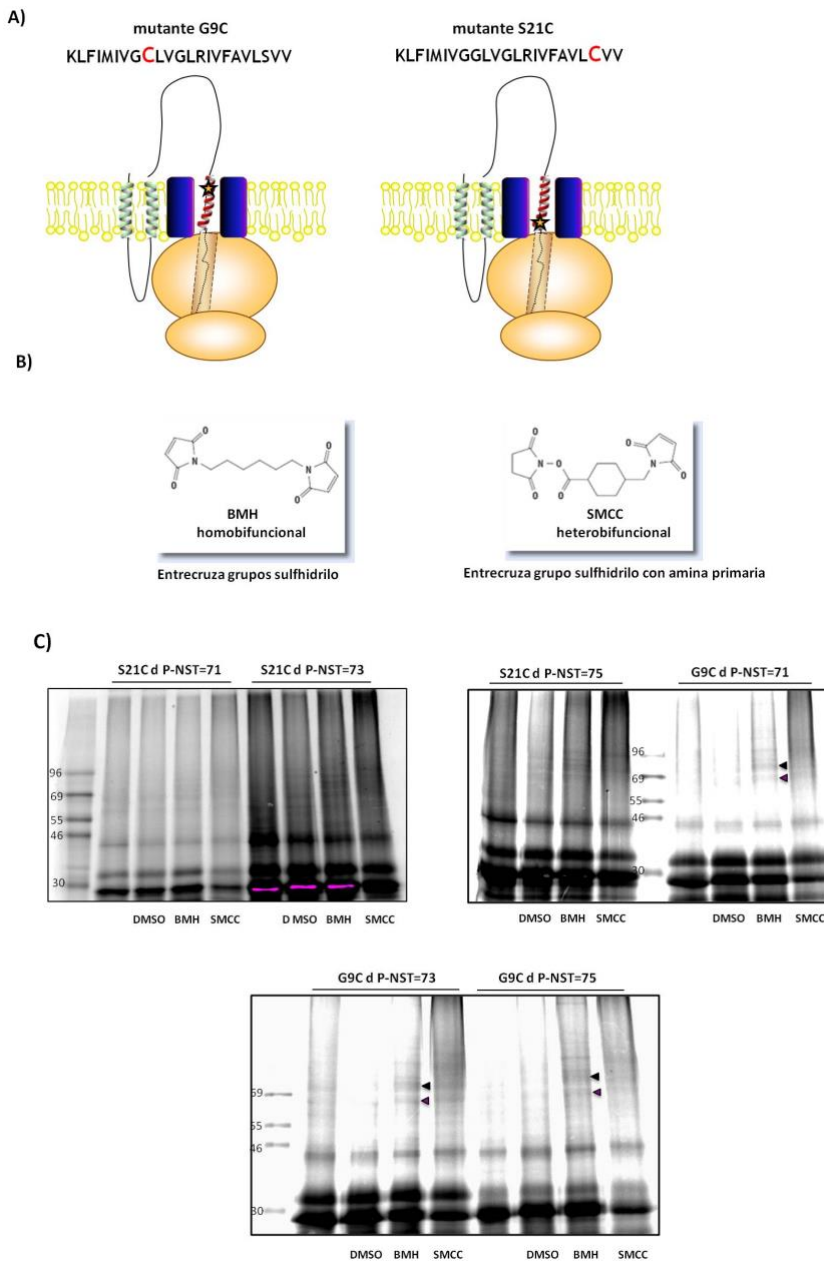


## **R1.D2. Interacción del TM de gp41 con la proteína TRAM durante el proceso de inserción en la bicapa.**

Como se ha comentado en la introducción (apartado I5), en determinadas ocasiones el particionamiento de los fragmentos TM a la bicapa lipídica no se puede explicar solamente por una apertura lateral del translocón y difusión del segmento que se encuentra en el canal directamente a la membrana. Así, algunas secuencias podrían quedar retenidas durante algún tiempo en un ambiente proteico diferente a Sec61 $\alpha$  como, se postula, es el caso de la interacciones descritas para ciertos TM con la proteína TRAM (Cross and High, 2009; Do et al., 1996; Heinrich et al., 2000; McCormick et al., 2003; Meacock et al., 2002; Saksena et al., 2004; Sauri et al., 2007). Muchos de estos fragmentos que se han observado adyacentes a TRAM poseen residuos cargados y una de las hipótesis que se plantea para la función de TRAM en estos casos es que proporciona un ambiente intermedio entre el canal acuoso del translocón y el ambiente altamente hidrofóbico de la membrana en el cual los TM poco hidrofóbicos pueden equilibrarse antes de ser embebidos en la bicapa lipídica. De esta forma, TRAM asistiría a la integración de estos TM marginalmente hidrofóbicos actuando como una “chaperona de membrana”. El TM de gp41 posee un residuo de arginina prácticamente en medio de su secuencia por lo que decidimos comprobar si podía existir una interacción con TRAM durante el proceso de su inserción cotraduccional. Para ello introdujimos cisteínas únicas en su secuencia con el objetivo de realizar experimentos de entrecruzamiento químico con intermediarios de traducción en los que el TM de gp41 se encontrara localizado ya fuera del ribosoma y hubiera podido acceder al canal del translocón. Un esquema de la estrategia utilizada se muestra en la figura R1.D2a. Una cisteína única fue introducida mediante mutagénesis dirigida en la posición 9 del TM de gp41 (G9C) mientras que en otro mutante ésta fue introducida en la posición 21 (S21C). Tras la traducción de truncados de diferente longitud para cada una de las

dos construcciones en presencia de membranas y  $^{35}\text{S}$  Met, las muestras se trataron con DMSO (control), y dos agentes entrecruzadores permeables a la membrana, BMH 0.5mM y SMCC 0.5mM. BMH es un entrecruzador homobifuncional que posee dos grupos maleimida reactivos, separados por un brazo espaciador de 13Å, que pueden interaccionar, cada uno de ellos, con un grupo sulfhidrilo de alguna cisteína accesible; SMCC es heterobifuncional con un grupo maleimida reactivo separado por un espaciador de 8.3 Å de un grupo reactivo succinimida, por lo que este agente puede reaccionar por una parte con una cisteína (grupo sulfhidrilo) y con la otra con una amina primaria (lisina). Si el TM de gp41 interacciona con TRAM probablemente seremos capaces de detectar un aducto del tamaño de los truncados de gp41 (unos 33 o 30 kDa, dependiendo de si han sido modificados por glicosilación o no, respectivamente) más TRAM generado por la interacción de la cisteína única introducida en el TM de gp41 con alguna cisteína o lisina de TRAM (ver su secuencia aminoacídica capítulo siguiente, apartado R2.B1). El tratamiento con los agentes entrecruzadores dio lugar a la identificación de dos aductos de 69 y 72 kDa para los truncados realizados con la construcción G9C pero no para S21C. Estos aductos parecen corresponder a la forma no glicosilada y glicosilada de los intermediarios, respectivamente, interaccionando con algún componente del RE que debe tener un peso molecular entre 35 y 37kDa. Este componente podría ser la proteína TRAM, ya que ésta tiene un peso molecular entre 35 y 38kDa.

Para corroborar si se trata de esta proteína se realizó una transferencia de las proteínas de los geles a membrana de nitrocelulosa y posterior inmunodetección (westen) utilizando un anticuerpo primario antiTRAM (cedido por el Dr. Arthur Johnson, College Station, Texas), los resultados se muestran en la figura R1.D3, donde se puede observar una prominente banda de aproximadamente 72 kDa y que corresponde a un aducto entre la



**Figura R1.D2. Entrecruzamiento químico de intermediarios del proceso de inserción cotraduccional del TM de gp41.** A) Esquema de las construcciones con cisteínas únicas utilizadas. La estrella simboliza la posición de la cisteína dentro del

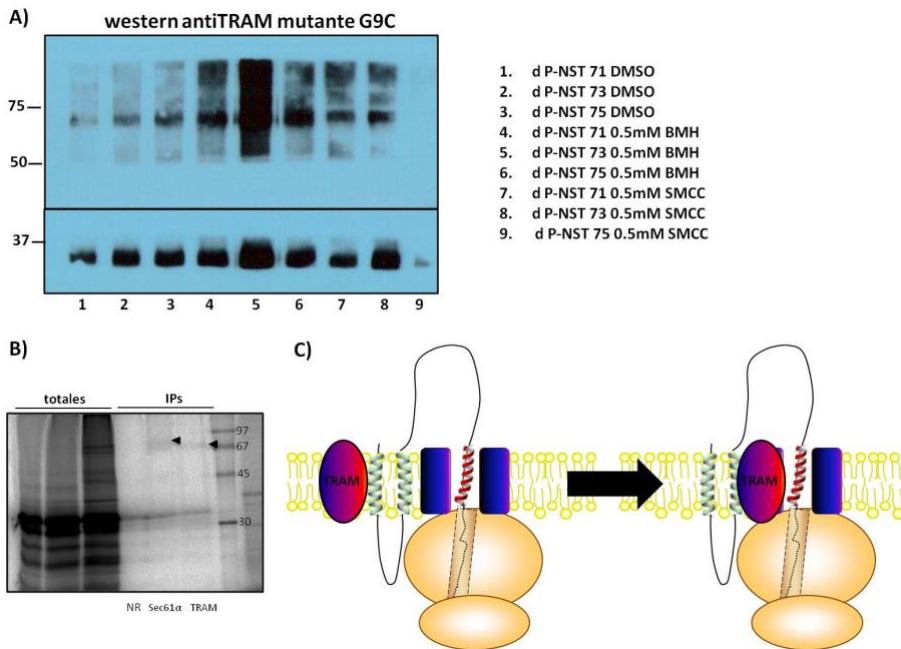
TM de gp41. B) Agentes entrecruzadores utilizados. C) Autorradiografía de geles SDS-PAGE resultado de los procesos de traducción y entrecruzamiento. Las bandas intensas por debajo del patrón molecular de 30kDa y por encima del mismo corresponden a las cadenas nacientes sin entrecruzar. La banda por debajo de 46 kDa son las cadenas nacientes truncadas que no han sido liberadas del tRNA. Las flechas negra y púrpura señalan los aductos formados.

cadena naciente que contiene el TM de gp41 entrecruzado con TRAM (como demuestra la banda radiactiva que se observó en la autorradiografía del gel SDS-PAGE, figura R1.D2).

En el mutante S21C no se obtuvieron aductos probablemente porque la cisteína situada en esa posición no está lo suficientemente próxima o correctamente orientada para reaccionar con los residuos reactivos de TRAM que se encuentran próximos al TM de gp41 cuando éste se encuentra en el translocón.

Con respecto a la inmunodetección debemos destacar que incluso en los controles con DMSO se obtuvo banda de entrecruzamiento, aunque más débil que en las muestras tratadas con agentes entrecruzadores. Esto es posible debido a que el tampón de muestras utilizado carecía de  $\beta$ -mercaptoetanol, lo que nos está indicando que puede darse la interacción entre los grupos tioles de la cisteína G9C del TM de gp41 y una de las cisteínas de TRAM en ausencia de agente entrecruzador exógeno; esto quiere decir que en el momento en que este TM se encuentra en el translocón TRAM, probablemente esté muy próxima a él (ya que para la formación de puentes disulfuro es necesario que los grupos sulfhidrilo estén aproximadamente a unos 2 Å uno del otro).

Para confirmar de una manera más directa que en realidad el aducto observado en la autorradiografía era nuestra cadena nascente entrecruzada con TRAM se volvió a traducir el intermediario G9C d P-NST=71, se trató con BMH y esta muestra fue inmunoprecipitada con anticuerpos anti Sec61α y TRAM. Efectivamente, se observó banda radiactiva tanto para la



**Figura R1.D3. Identificación del aducto entre el TM de gp41 y TRAM generado por entrecruzamiento químico.** A) Western con anticuerpo antiTRAM de los intermediarios de traducción Lep-TMgp41 en el mutante G9C que se encuentran en el canal del translocón. B) Inmunoprecipitación de los productos de entrecruzamiento con BMH 0.5mM del intermediario de traducción G9C d P-NST=71. NR, significa tratamiento con un suero no relacionado. Las flechas negras señalan los aductos. C) Modelo que propone la aproximación de TRAM al poro de Sec61α durante la inserción cotraduccional del TM de gp41.

inmunoprecipitación (IP) frente a Sec61 $\alpha$ , lo que nos indica que realmente el TM de gp41 se encuentra en el translocón, como para la IP frente a TRAM, que nos corrobora esta interacción durante el proceso de inserción cotraduccional de este TM que presenta un residuo con carga positiva en la mitad de su región hidrofóbica.

En el dibujo de la figura R1.D3c hipotetizamos que TRAM podría acercarse al TM de gp41 mientras se encuentra en el poro de Sec61 $\alpha$  para mediar su transición desde el canal acuoso hasta el ambiente hidrofóbico de la bicapa lipídica. Este caso podría ser un ejemplo más de que no siempre la integración de los fragmentos TM es un simple particionamiento mediado por un equilibrio termodinámico desde el canal del translocón hasta la bicapa, si no que, dependiendo de la naturaleza del fragmento en cuestión, pueden existir estadios intermedios en los que participen proteínas asociadas al heterotrímero Sec61 (como, se cree, es el caso de TRAM).

**R.2. Biogénesis, topología y ensayos  
funcionales de la proteína TRAM en  
membranas del RE.**

---

## **R2.A. Antecedentes.**

La proteína TRAM fue identificada como uno de los componentes de la maquinaria de translocación de las células de mamífero en el año 1992 por Görlich y colaboradores. En este primer trabajo los autores propusieron que TRAM podría formar algún tipo de canal a través del cual ciertos polipéptidos podrían ser transportados a través de la membrana del RE, aunque poco tiempo después se identificó el complejo Sec61 en mamíferos como verdadero translocón (Brundage et al., 1990; Gorlich and Rapoport, 1993). En este primer trabajo sobre TRAM (Gorlich et al., 1992) se demostró mediante reconstitución en proteoliposomas que la proteína TRAM (de una masa molecular aproximada entre 35 y 39 kDa) era necesaria para la translocación de dos proteínas de secreción, la  $\beta$ -lactamasa y el precursor del factor  $\alpha$ , sin embargo no era imprescindible para la translocación de la proteína precursora de prolactina, aunque aumentaba la eficiencia del proceso. El nombre de este componente del translocón se debe a la interacción con las cadenas nascentes que estaban siendo secretadas (*translocating chain-associating membrane protein* o TRAM), la cual fue demostrada mediante fotoentrecruzamiento y entrecruzamiento químico. A partir de estos resultados se concluyó que TRAM debía ser un componente esencial para ayudar en la translocación a ciertas proteínas que poseyeran poca afinidad de unión al translocón, mientras que para aquellas proteínas de secreción que tuvieran una elevada afinidad (como preprolactina) el requerimiento de TRAM no sería tan estricto y probablemente podrían ser translocadas con unas pocas moléculas presentes en la célula (Gorlich and Rapoport, 1993).

Estudios posteriores a lo largo de casi dos décadas han ido mostrando detalles de la participación de TRAM en los procesos de direccionamiento, translocación e integración cotraduccional en la membrana. Así, se



describió la interacción de TRAM con las secuencias señales de proteínas de membrana durante su direccionamiento hacia la membrana del RE (High et al., 1993; Mothes et al., 1994). Posteriormente, se realizó un estudio sistemático encaminado a caracterizar los requerimientos de las secuencias señales reconocidas por TRAM, identificándose secuencias señales dependientes e independientes de TRAM y estableciéndose una clasificación en el grado de requerimiento de ésta proteína para su translocación según su estructura (Voigt et al., 1996). Estos resultados mostraron que secuencias señales largas y con un núcleo hidrofóbico más prominente promueven la translocación de algunas proteínas de secreción independientemente de TRAM mientras que aquellas que tenían un núcleo hidrofóbico más corto requerían de la presencia de TRAM para que se promoviera la translocación del polipéptido; además se obtuvieron datos que demostraron que la participación de TRAM es necesaria para la inserción de la cadena nascente en el translocón, pero no para su direccionamiento previo. Otra de las funciones atribuidas a TRAM durante el proceso de translocación es la regulación de la exposición al citosol de algunos dominios de cadenas nascentes que ocurre en la unión entre el ribosoma y la membrana durante el proceso de secreción de algunas proteínas, evitando que regiones del polipéptido nascente que ya hayan sido translocadas sean de nuevo expuestas al citosol (Hegde et al., 1998).

Además de su implicación en los procesos tempranos de la translocación de las proteínas de secreción, pronto aparecieron evidencias de que TRAM también participa durante el proceso de integración cotraduccional de algunos segmentos TM en la bicapa lipídica (Do et al., 1996; Heinrich et al., 2000; McCormick et al., 2003; Saksena et al., 2004), facilitando el movimiento concertado de estos segmentos hidrofóbicos desde el ambiente acuoso del translocón hasta la membrana. Datos de entrecruzamiento con TRAM de fragmentos TM poco hidrofóbicos e incluso que albergan residuos cargados en el núcleo hidrofóbico durante los

procesos de integración cotraduccional han alimentado la hipótesis de que TRAM pueda actuar como una posible “chaperona de proteínas de membrana” que asista en la inserción de fragmentos TM débilmente hidrofóbicos (Cross and High, 2009; Heinrich et al., 2000; Meacock et al., 2002).

También ha sido descrito el entrecruzamiento de TRAM con fragmentos TM de proteínas víricas (Do et al., 1996; Saksena et al., 2004; Sauri et al., 2007; Sauri et al., 2005), permitiendo una comparación con un hipotético homólogo funcional en bacterias, YidC. La proteína YidC o “insertasa” se encuentra asociada al translocón SecYEG de bacterias siendo imprescindible para la inserción de la proteína de la cubierta del fago M13 y requerida para la del fago Pf3 (Kiefer and Kuhn, 2007; Samuelson et al., 2000; Serek et al., 2004). Además YidC participa en la asociación de subunidades de complejos proteicos que se encuentran en la membrana de procariontes como la subunidad  $F_0$  de la ATP sintasa, la subunidad II de la citocromo oxidasa y el canal mecanosensitivo MscL (Facey et al., 2007; van der Laan et al., 2004; van der Laan et al., 2003) y ha sido propuesta como un sitio de ensamblaje para proteínas politópicas de *E. coli* durante su proceso de inserción en la bicapa lipídica (Beck et al., 2001). A pesar de que los mecanismos de acción descritos para YidC y TRAM hasta la fecha difieren significativamente, se ha postulado también para TRAM una función de ensamblaje de fragmentos TM durante la integración de algunas proteínas politópicas que no sigan el modelo básico de particionamiento secuencial e independiente de cada TM desde el canal del translocón directamente a la membrana descrito anteriormente (apartado 15). Así, se ha propuesto que TRAM, junto con otras proteínas presentes en las cercanías del heterotrímero Sec61 (como por ejemplo TRAP o PAT-10), asistiría en el correcto ensamblaje e inserción de fragmentos TM atípicos (poco hidrofóbicos, con cargas, cortos, etc.) o de aquellos que requieran interacciones entre varios segmentos TM para adquirir el ensamblaje adecuado previamente a su inserción, sirviéndoles

de “andamio” donde permanecer hasta que estas interacciones se den y “estén preparados” para su paso a la membrana.

Recientemente se han publicado evidencias sobre la participación de TRAM en la ruta de degradación del RE mediada por estrés, aunque este nuevo papel no ha sido estudiado en profundidad (Oresic et al., 2009).

Con todos estos datos todavía se desconoce cuál es la función que TRAM realiza en las células y cuáles son los mecanismos exactos que utiliza durante los procesos de translocación/integración cotraduccional. La estructura de TRAM no está descrita todavía, por lo que resulta difícil inferir una función, por esta razón resulta especialmente interesante ofrecer una primera aproximación para entender cómo se dispone esta proteína en la membrana del RE determinando su topología y estudiando su biogénesis. La información topológica localiza los dominios proteicos hacia un lado u otro de la membrana y por ello puede facilitar posteriores trabajos de asignación de funciones a determinadas regiones del polipéptido. Además de la caracterización de TRAM, en este trabajo nos planteamos descubrir cuál es el requerimiento de TRAM durante los procesos de inserción cotraduccional de diversas proteínas.

## R2.B. BIOGÉNESIS Y TOPOLOGÍA DE TRAM.

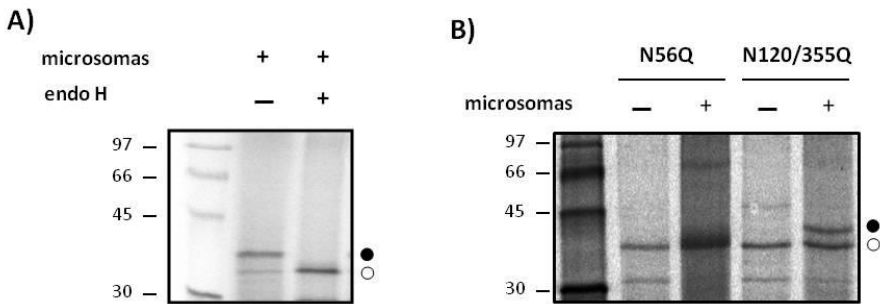
### R2.B1. TRAM se integra cotraduccionalmente en la membrana del RE.

Un primer paso en la caracterización de la proteína TRAM es la determinación del mecanismo que sigue para integrarse en la membrana del retículo endoplásmico. Existen dos mecanismos principales por los cuales las proteínas de membrana se integran en la bicapa: cotraduccional o postraduccional. En una primera aproximación para la caracterización de la proteína nos dispusimos a determinar cuál de estos dos mecanismos utiliza TRAM. La secuencia aminoacídica de TRAM se muestra en la figura R2.B1. La integración de proteínas de membrana en microsomas del RE puede ser seguida por glicosilación. Esta modificación la realiza el complejo enzimático oligosacaryltransferasa (OST), complejo multiproteico que está asociado al translocón (Nilsson et al., 2003).

AUSENCIA DE SECUENCIA SEÑAL		TM1 DIRIGE LA PROTEÍNA A LA MEMBRANA				
MAIRKKS	SNKN	PPLLSHEFL	QNHADIVSCL	AMLFLGLMF	EVTAKGAIIF	50
VALQYNV	TRP	ATEEQATESA	SLYHYGIKDL	ATVLFYMLVA	IIIHAIQEQY	100
VLDKINRR	RMH	FSKTKHSKFN	ESGQLSAFYL	FACVWGTFIL	ISENYISDPT	150
ILWRAYPH	NL	MTFQTKFFYI	SQLAYWLHAF	PELYFQKTKK	EDIPRQLVYI	200
GLYLFHI	AGA	YLLNLNHLGL	VLLVLHYFVE	FLFHISRLFY	FSDEKYQKGF	250
SLNAVLF	VLG	RLTLILSVL	TVGFGLARAE	NQKLDFTGY	FNVLAVRIAV	300
LASICITQ	AF	MMWKFINFQL	RRWREHSAFQ	APPVKRKP	PAV TKGRSSRKG	350
ENGVNGT	VT	TS	NGADSPRSRK	EKSS		374

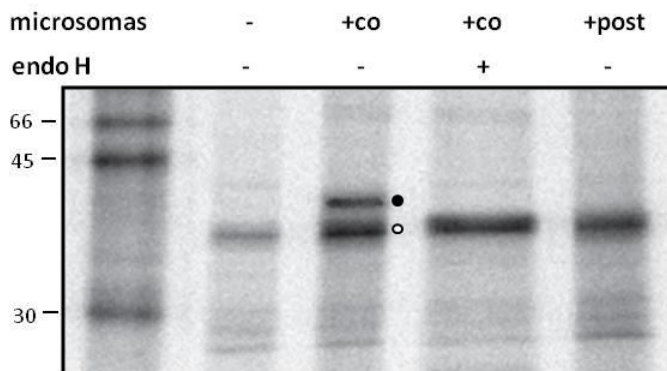
**Figura R2.B1. Secuencia aminoacídica de TRAM.** En morado se muestran las tres potenciales dianas de glicosilación (NXS/T), en amarillo los fragmentos TM predichos por los programas de predicción  $\Delta G$  *prediction server* (<http://dgpred.cbr.su.se>) para el primer TM y TMHMM ([www.enzim.hu/hmmt](http://www.enzim.hu/hmmt)) para el resto.

La OST añade residuos de azúcares cotraduccionalmente a secuencias consenso NX(S/T) (Silberstein and Gilmore, 1996), donde X es cualquier aminoácido excepto prolina (Shakin-Eshleman et al., 1996), cuando emergen del translocón. La glicosilación de una región proteica que está siendo traducida *in vitro* en presencia de membranas microsomales indica que esa zona del polipéptido está expuesta a la cara luminal del RE, ya que el centro activo de la OST se encuentra en este compartimento (van Geest and Lolkema, 2000). Esta modificación postraduccional aumenta la masa molecular de una proteína en aproximadamente 2.5 kDa. Este incremento en la masa molecular aparente se traduce en un retardo en la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida desnaturalizantes en presencia de SDS (SDS-PAGE) respecto a la misma proteína traducida en ausencia de microsomas. Cuando TRAM fue traducida *in vitro* en presencia de microsomas y metionina marcada con <sup>35</sup>S, la proteína resultó monoglicosilada. Este resultado se comprobó por tratamiento con endoglicosidasa H, una enzima que elimina los azúcares (Vilar et al., 2002), figura R2.B2a). Dado que en la secuencia de la proteína existen tres posibles dianas de glicosilación, N56VT, N120ES y N355GT, procedimos a investigar cuál de estas tres dianas naturales se modificaba en nuestro ensayo *in vitro*. Para ello se diseñaron dos mutantes, uno en el que eliminamos la primera diana de glicosilación (N56Q), y otro en el que se eliminaron las otras dos dianas (N120/355Q). La transcripción/traducción *in vitro* de estos mutantes se muestra en la figura R2.B2b, no observándose glicosilación en el mutante N56Q, mientras que el doble mutante N120/355Q fue eficientemente modificado. Estos resultados demuestran que es la primera diana la que se modifica cuando la proteína se integra en membranas de RE.



**Figura R2.B2. TRAM se inserta en membranas derivadas del RE y se glicosila en el residuo N56.** A) Traducción *in vitro* de TRAM en presencia de membranas y  $^{35}\text{S}$ -Met. La mitad del producto de traducción se trató con endoglicosidasa H (endo H) antes del análisis por SDS-PAGE y autorradiografía. B) Mutantes de TRAM traducidos en ausencia y presencia de microsomas. El círculo blanco representa las moléculas no glicosiladas mientras que el círculo negro las monoglicosiladas.

A pesar de que la presencia de modificación por glicosilación se produce mayoritariamente cuando secuencias consenso pasan a través del translocón y son accesibles al centro activo de la OST, no puede descartarse que la adición de azúcares pudiera realizarse “a posteriori”, y que TRAM se insertara en la membrana siguiendo un proceso post-traduccional. Para descartar esta posibilidad realizamos experimentos en los que la proteína fue traducida *in vitro* en ausencia de membranas y éstas fueron añadidas al finalizar la traducción. Para asegurarnos de que la traducción había finalizado añadimos cicloheximida (antibiótico que inhibe el inicio de la traducción) previamente a la adición de los microsomas. La ausencia de glicosilación (figura R2.B3) en estos experimentos demuestra que TRAM se integra en las membranas mediante un mecanismo cotraduccional.



**Figura R2.B3. TRAM sigue un mecanismo cotraduccional de integración en la membrana del RE.** Traducción de TRAM en presencia de membranas o añadiendo las membranas tras detener la traducción con cicloheximida (ver detalles en el texto).

**R2.B2. TRAM se integra en membranas del RE utilizando la SRP y el translocón.**

Para corroborar la vía cotraduccional de inserción decidimos estudiar si TRAM interaccionaba durante su biogénesis con los componentes del translocón implicados en la ruta de integración/translocación cotraduccional. Dado que la secuencia aminoacídica de TRAM carece de péptido señal escindible que lo dirija al RE, probablemente el primer segmento TM de la proteína actúe como “secuencia de anclaje” dirigiendo el complejo ribosoma-cadena naciente (RCN) al translocón para integrarse en la membrana. Para determinar si los ribosomas que están sintetizando TRAM son dirigidos cotraduccionalmente a la membrana del RE por la SRP se utilizó la técnica de fotoentrecruzamiento (Krieg et al., 1986; McCormick et al., 2003; Sauri et al., 2005; Sauri et al., 2009). En estos experimentos, RNAs mensajeros truncados con un codón de parada ámbar (TAG) aproximadamente en la mitad de la primera región hidrofóbica de la

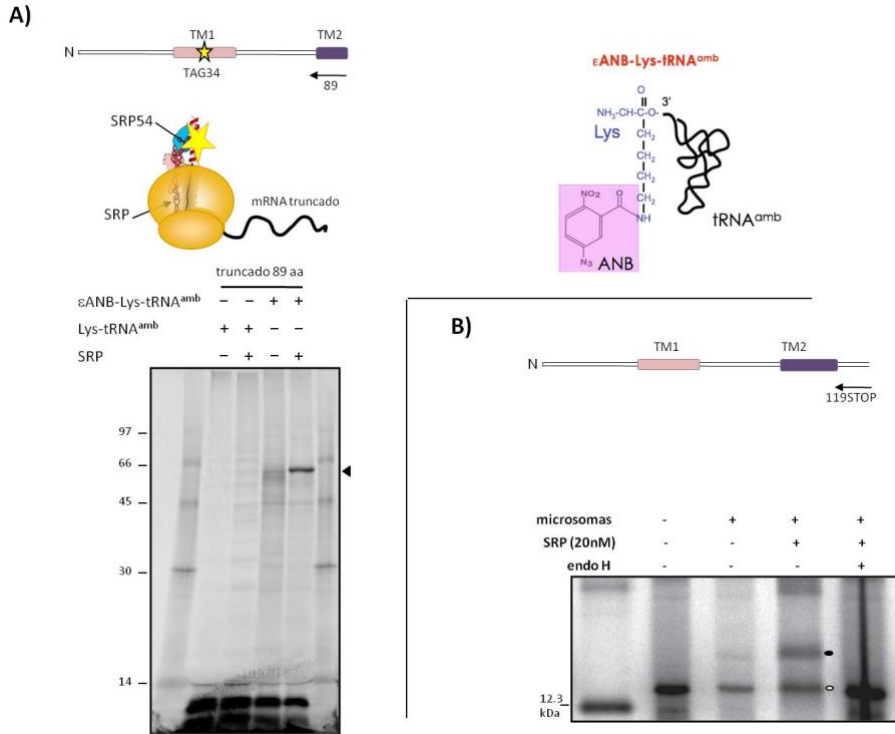
proteína fueron traducidos *in vitro* en presencia de aminoacil-tRNAs supresores del codón ámbar ( $\epsilon$ ANB-Lys-tRNA<sup>amb</sup>) y de SRP. En estas condiciones el ribosoma traduccionalmente activo se detiene al llegar al final de un mRNA truncado, pero la cadena nascente no se disocia porque el ribosoma no detecta el final de la traducción debido a la ausencia de codón de parada, de manera que se genera un verdadero intermediario estático del proceso de traducción. En estos ensayos no se añadieron membranas para evitar que el complejo RCN se dirigiera al RE y quedara así un mayor tiempo unido a la SRP para favorecer el fotoentrecruzamiento con la misma. Los aminoacil-tRNAs supresores del codón ámbar utilizados están cargados con un residuo de lisina derivatizado con la sonda 5-acido-2-nitrobenzoil (ANB) fotoactivable ( $\epsilon$ ANB-Lys-tRNA<sup>amb</sup>, figura R2.B4a derecha), que al ser irradiada entrecruza la cadena nascente en la que se ha incorporado con cualquier polipéptido que se encuentre a una distancia inferior a 5 Å de la sonda. En estas condiciones, los productos de traducción de los primeros 89 aminoácidos de TRAM se fotolizaron para que la sonda pudiera reaccionar con aquellas moléculas que encuentre a su alrededor. Para posicionar el codón ámbar en el medio del primer TM tuvimos, previamente, que predecir su localización. Para ello se utilizó el servidor  $\Delta G$  prediction server (<http://dgpred.cbr.su.se>). Este programa predice que el primer segmento TM se expande desde el aminoácido 24 hasta el 44. El codón ámbar se introdujo en la posición 34 de la secuencia de TRAM (TAG34), aproximadamente en medio de la región TM predicha (figura R2.B4a). Con objeto de que la sonda esté accesible a la maquinaria celular de direccionamiento a membranas, se sintetizaron intermediarios de la biosíntesis de 89 residuos. Previamente, Saurí et al. (2005), mostraron que una longitud de 55 residuos entre la sonda fotoreactiva (TAG34) y el sitio P (residuo 89) es suficiente para que la sonda quede expuesta fuera del túnel ribosomal y accesible a la SRP. Cuando los complejos ribosoma/cadena nascente (RCN) fueron irradiados con luz ultravioleta, sólo cuando a la mezcla de reacción se le añadió SRP y  $\epsilon$ ANB-Lys-tRNA<sup>amb</sup>, se observó un



fotoaducto de aproximadamente 63 kDa a niveles significativos, pero estos aductos no se observaron en presencia de un Lys-tRNA<sup>amb</sup> (figura R2.B4a). La masa molecular aparente de este fotoaducto corresponde a la de la cadena naciente de 89 aminoácidos más la subunidad de 54 kDa de la SRP (SRP54). En los casos en que la sonda fotorreactiva no estaba presente o fue sustituida por el aminoacil-tRNA (Lys-tRNA<sup>amb</sup>) sin modificar no se detectaron aductos. Estos resultados demuestran que el primer TM es adyacente a la subunidad 54 de la SRP, por lo que debe estar actuando como secuencia señal para dirigir al complejo RCN al translocón de la membrana del RE.

Para confirmar que la SRP es requerida en el direccionamiento de TRAM a la membrana realizamos experimentos de traducción *in vitro* suplementando la mezcla con SRP purificada. El extracto de ribosomas utilizado tanto en los experimentos de fotoentrecruzamiento como en éste proviene del germen del trigo y la principal característica que le diferencia del lisado de reticulocitos (utilizado en los demás ensayos de esta tesis doctoral) es que su contenido en SRP es menor (Kanner et al., 2002). Para este ensayo de traducción *in vitro* utilizamos un mRNA que codifica para un polipéptido del extremo N-t de TRAM que abarca únicamente los primeros 119 aminoácidos más un codón de parada (119+STOP). Este polipéptido incluye la diana de glicosilación funcional de la proteína (N<sub>56</sub>VT) cuya modificación es indicativa de integración en las membranas microsomales. Este polipéptido contiene los dos primeros TM de la secuencia de TRAM así como la diana de glicosilación modificable por la OST que describimos previamente. El resultado de la traducción *in vitro* en presencia de membranas en este sistema sin añadir y añadiendo SRP purificada exógena se muestra en la figura R2.B4b. La presencia de glicosilación indica un eficiente direccionamiento e integración en la membrana de los microsomas; en ausencia de SRP añadida los niveles de glicosilación son muy bajos, lo que sugiere que la escasa cantidad de esta partícula presente

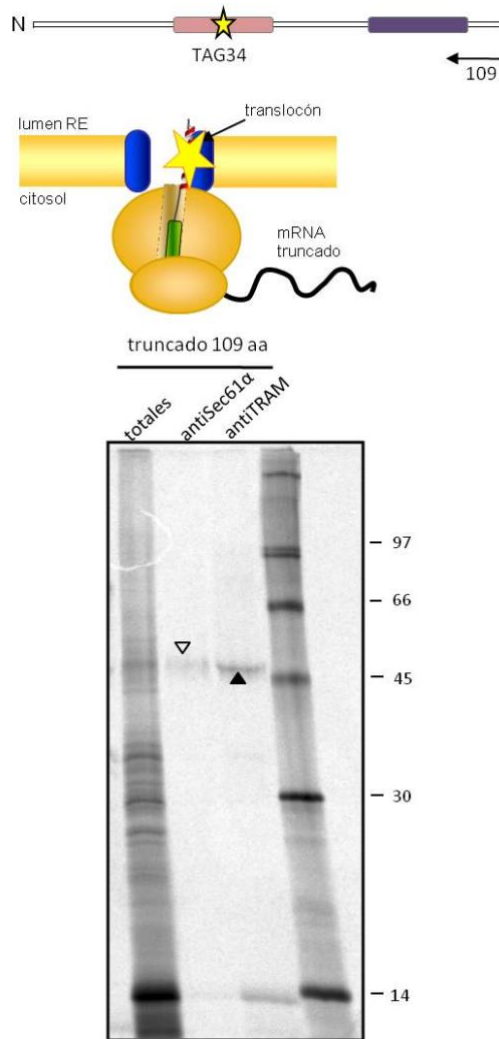
en los extractos celulares de germen de trigo no es suficiente para dirigir a la totalidad de moléculas hasta la membrana del RE.



**Figura R2.B4.** A) Fotoentrecruzamiento de TRAM con la SRP en los primeros estadios de su biogénesis. Una única sonda fotoreactiva se incorporó mediante la introducción de un codón de parada ámbar en la posición 34; RCNs radiactivas de 89 residuos se tradujeron en presencia de Lys-tRNA<sup>amb</sup> sin modificar o de la sonda fotoreactiva  $\epsilon$ ANB-Lys-tRNA<sup>amb</sup>. B) Productos de traducción *in vitro* en germen de trigo del polipéptido 119+STOP en presencia o ausencia de SRP. La última carrera corresponde a un control con endoglicosidasa H (endo H) que confirma que la banda de menor movilidad corresponde al polipéptido glicosilado.

En cambio, al añadir SRP purificada a la mezcla de traducción los niveles de glicosilación aumentan sustancialmente confirmando que el

direccionamiento de TRAM a la membrana se produce a través del reconocimiento de la primera región hidrofóbica como secuencia señal por la SRP. En la biogénesis de las proteínas de membrana, las secuencias señales de proteínas que se insertan de forma cotraduccional son reconocidas dos veces, primero por la SRP que las dirige a la membrana del RE, y después por el translocón para iniciar la inserción de estas secuencias hidrofóbicas en la bicapa lipídica. Por ello, nos dispusimos a comprobar si TRAM sigue también este patrón determinando si después del direccionamiento por la SRP, la secuencia señal es adyacente a componentes principales de la maquinaria de integración/translocación. Para identificar las proteínas adyacentes a TRAM durante su proceso de inserción se crearon intermediarios de su biosíntesis generando cadenas nacientes de 109 aminoácidos en presencia de membranas microsomales, basándonos en datos previos descritos por Saurí et al. (2005). La sonda fotorreactiva fue incorporada mediante la traducción de mRNAs truncados con un codón de parada ámbar en la posición 34 (TAG34) en presencia de  $\epsilon$ ANB-Lys-tRNA<sup>amb</sup> como ha sido descrito anteriormente. El intermediario de traducción/inserción sintetizado se irradió con luz ultravioleta para generar fotoaductos, y el resultado de este procedimiento fue analizado mediante inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-sec61 $\alpha$  y anti-TRAM. Los resultados de estos experimentos muestran que la secuencia señal de TRAM es adyacente a Sec61 $\alpha$  y a una molécula de TRAM presente en los microsomas (Figura R2.B5), por lo que podemos concluir que la inserción de TRAM en la membrana del RE tiene lugar a través del complejo multiproteico del translocón.

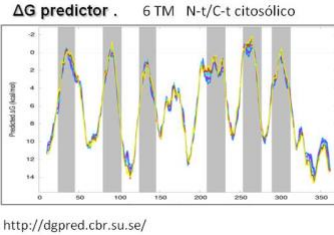
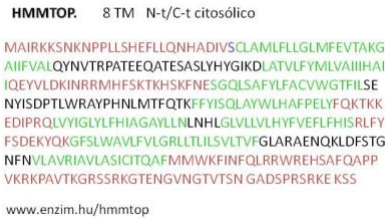
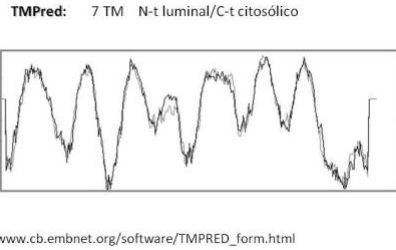
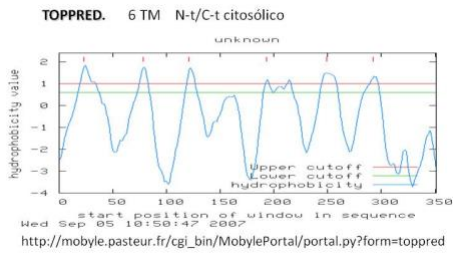


**Figura R2.B5. TRAM interacciona con Sec61 $\alpha$  y TRAM durante los primeros estadios de su biogénesis.** Para los experimentos de fotoentrecruzamiento con Sec61 $\alpha$  y TRAM se utilizaron cadenas nacientes truncadas de 109 aminoácidos; tras la fotolisis en presencia de membranas, la mitad de la mezcla de reacción se separó y se inmunoprecipitó con suero antiSec61 $\alpha$  y antiTRAM respectivamente.

### **R2.B3. Determinación de la topología de TRAM.**

La determinación de la topología de los componentes del translocón es esencial para comprender la relación entre estructura/función de la maquinaria de translocación. La topología en membranas de la subunidad  $\alpha$  del heterotrímero Sec61 fue determinada en levadura usando fusiones C-terminales de dominios reporteros y digestiones con proteasas, datos que demostraron la presencia de 10 fragmentos TM. (Wilkinson et al., 1996). La estructura cristalina del homólogo arqueano mostró que Sec61 $\alpha$  estaba constituida por dos dominios de cinco segmentos TM cada uno, que formaban una estructura en forma de bivalvo que podía proporcionar una apertura lateral para que los TM de las cadenas nacientes pudieran particionar a la fase lipídica (Van den Berg et al., 2004). Sin embargo, hasta la fecha no existía información topológica ni estructural respecto al otro componente del translocón, TRAM. En base a análisis de hidrofobicidad se creía que TRAM debía atravesar la membrana del RE ocho veces (Gorlich et al., 1992), sin embargo, hasta el día de hoy no existían datos topológicos ni estructurales de TRAM que permitieran inferir un mecanismo de acción como componente del translocón, por ello nos dispusimos a definir su topología como una primera aproximación para comprender su función.

Al introducir la secuencia aminoacídica de TRAM en distintos programas de predicción de topología de proteínas de membrana que existen en la red no encontramos un consenso en el número de segmentos TM que cada uno de ellos asignaba a TRAM, ni, en consecuencia, en la orientación de sus extremos N y C-terminales (Figura R2.B6), por lo que una aproximación experimental era estrictamente necesaria para poder resolver su topología.



**Figura R2.B6. Programas de predicción de topología de proteínas de membrana.** Algunos de los programas utilizados para hacer una primera aproximación a la topología de TRAM. Los diferentes programas no coincidían ni en el número de segmentos TM ni en la asignación de la topología. Por ello es necesaria una aproximación experimental.

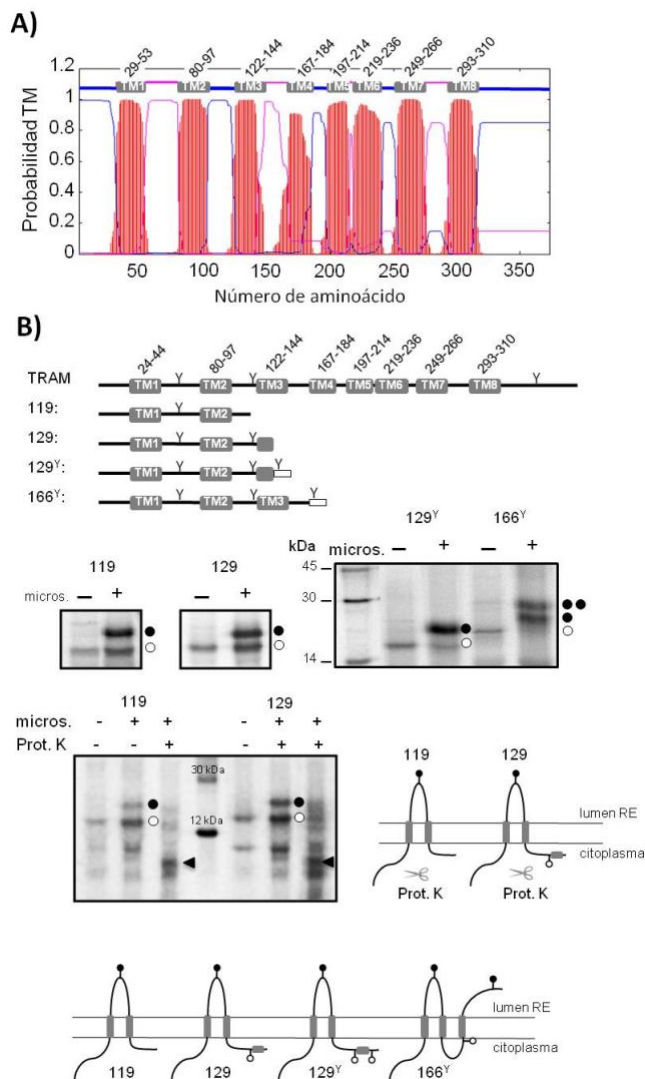
Dado que la secuencia señal de TRAM es reconocida por la SRP y por componentes del translocón (Sec61 $\alpha$  y la propia TRAM), y, la primera secuencia consenso de glicosilación (N<sub>56</sub>VT) que se encuentra inmediatamente después de esta región es modificada eficientemente, esta primera región hidrofóbica de la proteína debe actuar como primer segmento TM a la vez que de secuencia de direccionamiento a la membrana, comprendiendo aproximadamente desde el residuo 24 hasta el residuo 44, de acuerdo con la predicción del programa  *$\Delta G$  prediction server*.

Para la determinación del número de segmentos que atraviesan la membrana presentes en la proteína y la topología de los mismos se diseñó una estrategia basada en la adición de etiquetas de glicosilación en el extremo C-t de polipéptidos derivados de la secuencia de TRAM. Mediante PCR y añadiendo en el oligonucleótido reverso una secuencia de glicosilación, más tres aminoácidos (MSM), seguidos de un codón de parada (NST+MSM+STOP), se generaron fragmentos de DNA conteniendo sucesivamente las diferentes regiones de TRAM. Los diferentes polipéptidos abarcaron progresivamente las diferentes regiones transmembranales putativas seguidas de una diana de glicosilación en el extremo C-t, de manera que la presencia o no de glicosilación en esta segunda diana adicional es indicativa de la orientación que tiene el segmento TM que la precede, ya que, como se ha mencionado anteriormente, los lazos que se localicen en el lumen del RE podrán ser glicosilados mientras que los que estén orientados al citosol no. La existencia o no de moléculas glicosiladas nos va indicando hacia qué parte de la membrana queda orientado el C-t del polipéptido analizado. Todas las construcciones generadas por PCR se representan en las figuras R2.B7 y R2.B8. Como se muestra en la figura R2.B7b, el producto de la traducción *in vitro* que contiene los 119 primeros aminoácidos de TRAM, incluyendo los dos primeros potenciales TM y el sitio de glicosilación nativo (N<sub>56</sub>VT), fue eficientemente glicosilado en presencia de microsomas, sugiriendo la translocación del lazo hidrofílico que contiene el sitio de glicosilación. El polipéptido que abarca los 129 primeros aminoácidos, que incluye los dos primeros TM y la segunda diana de glicosilación potencial (N<sub>120</sub>ES), se monoglicosiló, indicando que esa región efectivamente contiene un segundo fragmento TM precediendo la Asn120 lo que impide su modificación. La traducción del mismo polipéptido pero esta vez etiquetado con la secuencia **NSTMSM** (129<sup>Y</sup>), confirmó esta topología, ya que a pesar de presentar tres dianas de glicosilación únicamente se modificaba la Asn56. Estos resultados fueron confirmados mediante digestiones con proteinasa K (PK). Esta proteasa no puede

atravesar las membranas microsomales por lo que únicamente puede degradar aquellas regiones polipeptídicas expuestas al exterior de los microsomas (ver esquema). En estas condiciones la transcripción/traducción *in vitro* y la posterior digestión con PK de las construcciones de 119 y 129 residuos genera bandas electroforéticas cuya migración corresponde a fragmentos polipeptídicos formados por las dos regiones TM y el lazo que las conecta con el sitio de glicosilación modificado. La inserción del tercer segmento TM se demostró generando un polipéptido que abarcaba hasta el aminoácido 166, etiquetado con la misma secuencia (**NSTMSM**) en C-t (166<sup>Y</sup>). La doble glicosilación de este polipéptido indica que el tercer potencial TM se inserta eficientemente en la membrana y que la región hidrofílica C-t es translocada al lumen del RE (ver esquema en la parte inferior de la figura R2.B7b).

El análisis del polipéptido de 196 residuos con la etiqueta de glicosilación (196<sup>Y</sup>) generó principalmente moléculas monoglicosiladas (figura R2.B8), lo que indica la presencia de un cuarto segmento TM en esta región de la proteína. Teniendo en cuenta la predicción de la topología de TRAM obtenida con la mayoría de los programas utilizados, sólo unos pocos aminoácidos separan los TM5 y 6 (figuras R2.B7 y R2.B8). En este contexto, si el último TM del polipéptido 217<sup>Y</sup> termina aproximadamente en el residuo 214, solo existen cuatro aminoácidos desde la cara luminal de la membrana del RE hasta la etiqueta de glicosilación C-terminal, y son necesario un mínimo de 12-13 para que la diana de glicosilación sea accesible a la OST y eficientemente modificada (Li et al., 2008; Monne et al., 1998; Nilsson and von Heijne, 2000; Nilsson and von Heijne, 1993; Stefansson et al., 2004).

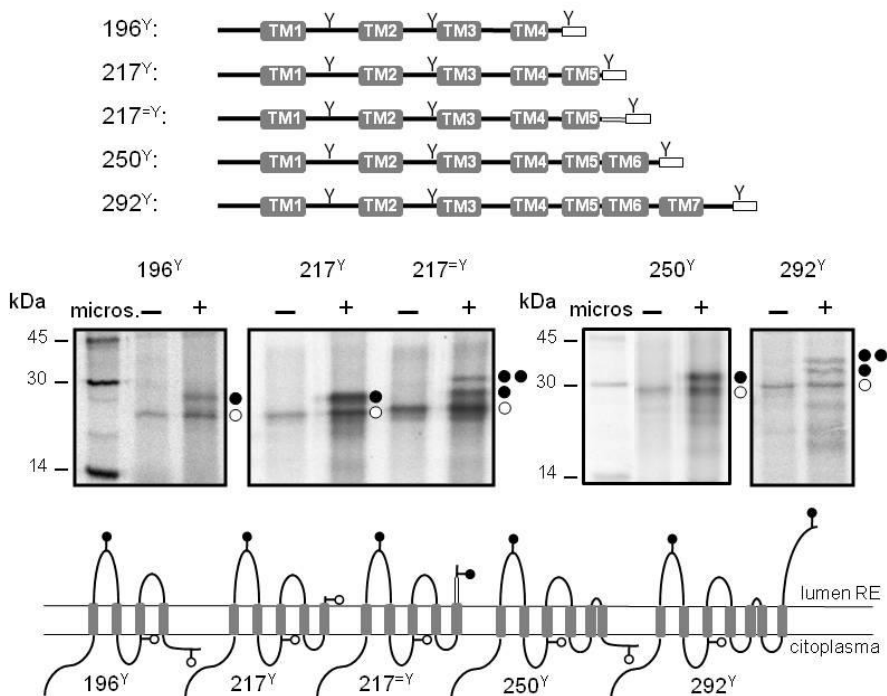




**Figura R2.B7. Estrategia para determinar la topología de la proteína TRAM.** A) Predicción de la topología de TRAM usando el algoritmo TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). B) Expresión *in vitro* y análisis por SDS-PAGE de polipéptidos de distinto tamaño derivados de la secuencia de TRAM. En la parte superior se muestra un esquema de la proteína completa y de los truncados de TRAM generados por PCR. Los dibujos muestran modelos de la topología que adquieren estos truncados en la membrana del RE. En los experimentos de PK, la punta de flecha muestra el producto protegido de aproximadamente 8 kDa.

Para estudiar esta región de la secuencia de TRAM diseñamos dos constructos, uno con la etiqueta inmediatamente después del residuo 217 (217<sup>Y</sup>), justo antes del comienzo de la siguiente región hidrofóbica, y otro al que le añadimos un lazo flexible con el objetivo de alejar la diana de glicosilación de la membrana (217<sup>=Y</sup>, ver esquema figura R2.B8). La secuencia de aminoácidos en esta etiqueta en C-t alargada es GGMGMGGGMM**N**STMSM (figura R2.B8). Los resultados de la traducción en presencia de membranas microsomales de estas construcciones demuestran que la región de TRAM que abarca desde el aminoácido 197 hasta el 214 forma el quinto fragmento TM de la proteína.

Similares experimentos fueron realizados para detectar los siguientes fragmentos TM, tal y como puede observarse en la figura R2.B8. Finalmente, la glicosilación de solo la primera diana de las tres que posee TRAM en su secuencia combinada con la ausencia de modificación en el mutante N56Q confirma la existencia de 8 fragmentos TM.

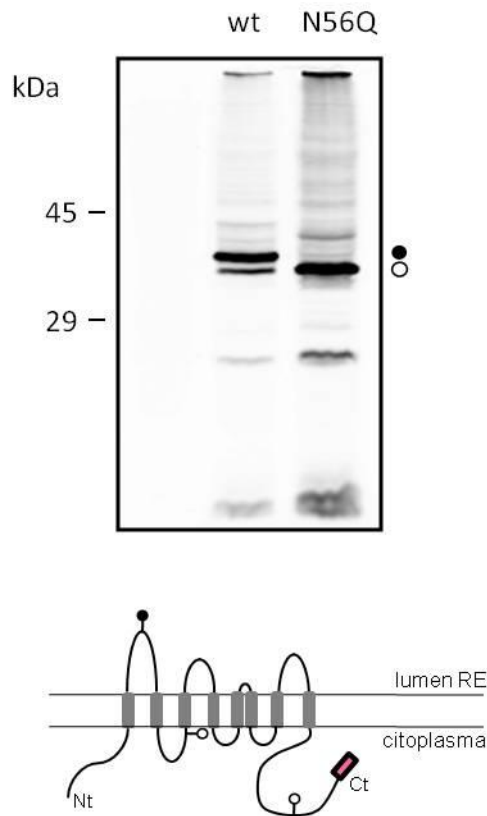


**Figura R2.B8. Orientación alternante de los segmentos TM de TRAM.** La traducción *in vitro* de polipéptidos de la secuencia de TRAM en los que la etiqueta de glicosilación en el extremo C-t proporciona una interpretación sencilla de su topología. Se muestran los esquemas de las construcciones ensayadas en la parte superior y modelos de cómo se insertan en la bicapa lipídica en la parte inferior de la figura.

### Topología de TRAM en células de mamífero.

Para confirmar que la topología de TRAM descrita *in vitro* es la misma que la que la proteína adquiere en el RE de células de mamífero construimos la quimera TRAM-V5, que consiste en fusionar el epítipo V5 al extremo C-t de TRAM en un vector con el promotor de citomegalovirus. La quimera se transfectó y sobreexpresó en un cultivo de células HEK293. Al día siguiente las células se lisaron y el extracto fue analizado por transferencia e

inmunodetección (western) utilizando un anticuerpo anti-V5. La figura R2.B9 muestra que el constructo con la secuencia nativa de la proteína se monoglicosila y, en cambio, el mutante N56Q pierde la modificación. Estos datos confirman que la primera diana de glicosilación es también modificada en células eucariotas y que probablemente TRAM adopta la misma topología *in vivo* que la observada en los experimentos *in vitro* usando membranas derivadas del RE.



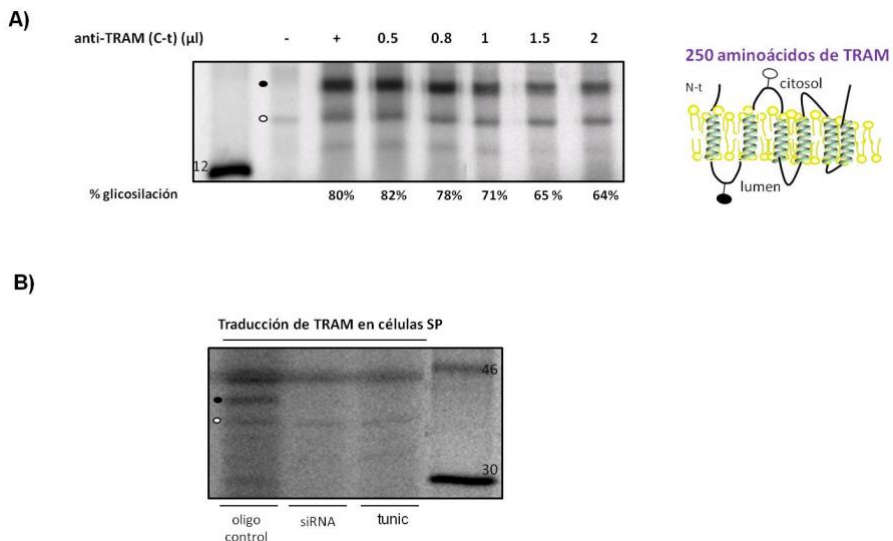
**Figura R2.B9. Glicosilación de TRAM sobreexpresada en células HEK293.** Glicosilación de TRAM en células transfectadas con un vector que contiene la fusión de TRAM al epítipo V5 en su extremo C-t y del mutante N56Q. El modelo de la topología de TRAM se muestra en la parte inferior. El cuadrado rosa representa la etiqueta V5.

## **R2.C. LA DEPLECIÓN DE LA TRAM MICROSOMAL ENDÓGENA AFECTA A LA INSERCIÓN DE LA PROPIA TRAM.**

Tras haber observado por fotoentrecruzamiento que la TRAM endógena se encuentra adyacente a la propia cadena nascente de TRAM cuando ésta se dirige a la membrana del RE (apartado R2.B2), quisimos saber si existía un requerimiento real durante el proceso de integración de la proteína en la bicapa lipídica. Para ello diseñamos una estrategia que consiste en deplecionar parcialmente la cantidad de TRAM presente en los microsomas utilizando para ello un anticuerpo anti-TRAM que reconoce a la proteína en su extremo C-t y traduciendo *in vitro* los primeros 250 aminoácidos del polipéptido para determinar, utilizando como característica indicativa los niveles de glicosilación, su eficiencia de integración cuando al sistema se le han reducido niveles significativos de TRAM endógena. El resultado de esta primera aproximación para el estudio del requerimiento de TRAM durante la integración de proteínas en la membrana del RE se muestra en la figura R2.C1a. En este ensayo se utilizó un polipéptido que contenía los primeros 250 aminoácidos de TRAM para conseguir que el anticuerpo anti-TRAM (que reconoce el extremo C-t de la proteína) se uniera solamente a la TRAM endógena presente en los microsomas y no a la que sintetizamos *in vitro*. Cantidades crecientes de anticuerpo se adicionaron a la mezcla de traducción observándose que, a medida que la cantidad de moléculas de TRAM activas disminuía, los niveles de glicosilación y en consecuencia de integración del polipéptido de 250 aminoácidos eran cada vez menores. No se pudo aumentar más la cantidad de anticuerpo añadido (para intentar observar un efecto más drástico en la pérdida de inserción) debido a que probablemente, la traducción, el direccionamiento a la bicapa o ambas cosas quedan inhibidas cuando se elimina TRAM de las membranas.

Para demostrar con una técnica más precisa que realmente TRAM participaba activamente en la integración transmembranal de ella misma

utilizamos una estrategia de inhibición de su expresión en células HeLa en cultivo mediante RNA de interferencia. Estos experimentos se realizaron durante una estancia en el laboratorio del profesor Stephen High en la Universidad de Manchester (Inglaterra). Mediante un siRNA (*small interfering RNA*) específico para TRAM se redujo la cantidad de TRAM presente en las células, posteriormente estas células se permeabilizaron parcialmente con digitonina y se utilizaron para generar un extracto de membranas derivadas de RE (células semipermeabilizadas o células SP) que eran deficitarias en TRAM. Estas membranas se añadieron a la mezcla de traducción *in vitro* de la totalidad de la secuencia aminoacídica de TRAM (figura R2.C1b). Los detalles de la técnica se tratan más ampliamente en el apartado R2.E, donde empleamos esta estrategia para determinar los requerimientos de TRAM durante la inserción cotraduccional de diversas proteínas. La mitad del cultivo de células HeLa fue tratada con un oligonucleótido control que es incapaz de formar un complejo silenciador y la otra mitad con el siRNA anti-TRAM, además se realizó un control con tunicamicina, droga que inhibe la adición de azúcares por la OST, para poder distinguir claramente qué bandas correspondían a la proteína modificada por glicosilación (figura R2.C1b). Cuando TRAM se tradujo utilizando un extracto celular en el que la expresión endógena de la propia TRAM no había sido manipulada, los niveles de glicosilación del producto de traducción fueron elevados, indicando que TRAM había particionado al entorno lipídico correctamente. Por el contrario, la misma mezcla de traducción utilizando células que habían sido tratadas con el RNA de interferencia rindieron productos no glicosilados, lo que indicaba que TRAM no se había integrado en la membrana del RE con su topología nativa. Estos resultados confirman que TRAM es estrictamente necesaria para su propio ensamblaje en la bicapa lipídica.



**Figura R2.C1. TRAM es estrictamente necesaria durante el proceso de inserción cotraduccional de la propia TRAM.** A) Efecto de deplecionar TRAM mediante anticuerpos. La autorradiografía del gel SDS-PAGE muestra los niveles de glicosilación total de la diana N<sub>56</sub>VT de la traducción *in vitro* de un polipéptido conteniendo los primeros 250 aminoácidos de TRAM en presencia de microsomas a los que se les ha añadido cantidades crecientes de un anticuerpo anti C-t de TRAM. B) Inhibición de la expresión de TRAM en células HeLa mediante siRNA. La foto muestra la traducción *in vitro* de la secuencia de TRAM utilizando como fuente de membranas un extracto de células deficitario en TRAM.

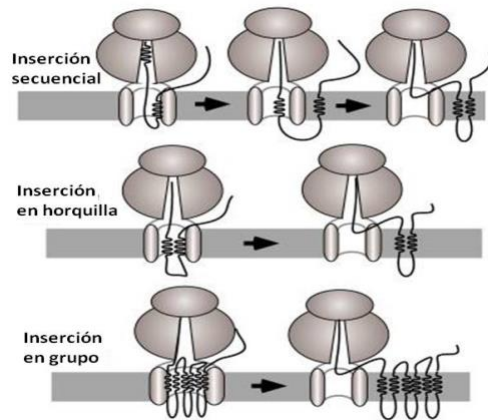
Observando la figura R2.C1 parece evidente que TRAM no solamente se encuentra adyacente (como vimos en el apartado R2.B mediante fotoentrecruzamiento de cadenas nacientes, figura R2.B4) sino que también es necesaria para la inserción eficiente de la misma TRAM durante su proceso de biogénesis. Esta primera aproximación para determinar cuán importante es TRAM durante la integración cotraduccional de proteínas en la membrana tiene un elevado interés debido a que no existen evidencias previas que demuestren que este componente del translocón participa activamente en este proceso.

## **R2.D. DISECCIONANDO EL ENSAMBLAJE DE TRAM.**

### **R2.D1. Inserción independiente de los segmentos TM de TRAM marginalmente hidrofóbicos.**

En el apartado anterior hemos determinado la topología de TRAM utilizando polipéptidos que progresivamente incorporaban las diferentes regiones hidrofóbicas de la proteína, comprobando que, a medida que se va elongando la cadena polipeptídica, los segmentos TM uno a uno se iban insertando en la bicapa lipídica. Sin embargo, desconocemos si durante el proceso cotraduccional de integración en la membrana, los distintos segmentos TM se insertan de forma independiente o si existen interacciones entre los distintos fragmentos que faciliten, en un proceso cooperativo, su integración. Las hipótesis actuales acerca de la topogénesis y el ensamblaje de las proteínas politópicas apuntan a que el complejo ribosoma/translocón monitoriza las características de secuencia y/o estructurales de la cadena naciente durante su síntesis, y, así, mediante cambios conformacionales podría señalar los mecanismos de inserción y plegamiento de la proteína en la membrana. En este sentido, en lugar de una difusión pasiva desde el translocón a la bicapa lipídica dirigida únicamente por la hidrofobicidad de cada segmento aislado, se ha propuesto un modelo más dinámico en el que la adquisición de la estructura terciaria de las proteínas politópicas estaría gobernada por diversos reajustes en la estructura del polipéptido naciente mediante diversos mecanismos que se integran para dar lugar a un correcto ensamblaje en la membrana. La figura R2.D1 muestra una simplificación de los distintos modelos propuestos para la integración de TMs de proteínas politópicas..





**Figura R2.D1. Mecanismos de inserción cotraduccional de proteínas politópicas.** Durante la biogénesis, los TM son transferidos lateralmente desde el translocón a la membrana del RE. Esto puede ocurrir de manera secuencial e independiente, en horquilla ó en grupos de haces de hélices TM. Tomado de (Skach, 2009).

Las distintas formas en las que puede ocurrir este proceso se pueden resumir en: i) una inserción secuencial, en la que cada segmento TM abandona el entorno del translocón integrándose en la membrana individualmente; ii) inserción en horquilla, en la que pares de hélices TM generalmente separadas por lazos formados por pocos aminoácidos se integran conjuntamente en la membrana; y iii) inserción en bloque, en la que los distintos segmentos TM sufrirían un empaquetamiento en el interior o en las proximidades del translocón para finalmente integrarse en la membrana como un haz de hélices. Al menos en los dos últimos modelos, la integración de segmentos TM poco hidrofóbicos puede ser facilitada por la presencia de otros segmentos TM adyacentes. El TM que dirige la

integración no se integraría inmediatamente en la membrana tras su paso por el canal del translocón, sino que permanecería cercano al complejo para recoger al fragmento poco hidrofóbico y asistirle acompañándolo en su inserción. Existen evidencias experimentales que indican que pares de hélices TM interaccionan entre ellas antes de integrarse en la membrana (Heinrich and Rapoport, 2003; Sadlish et al., 2005; Sauri et al., 2005; Skach and Lingappa, 1993)

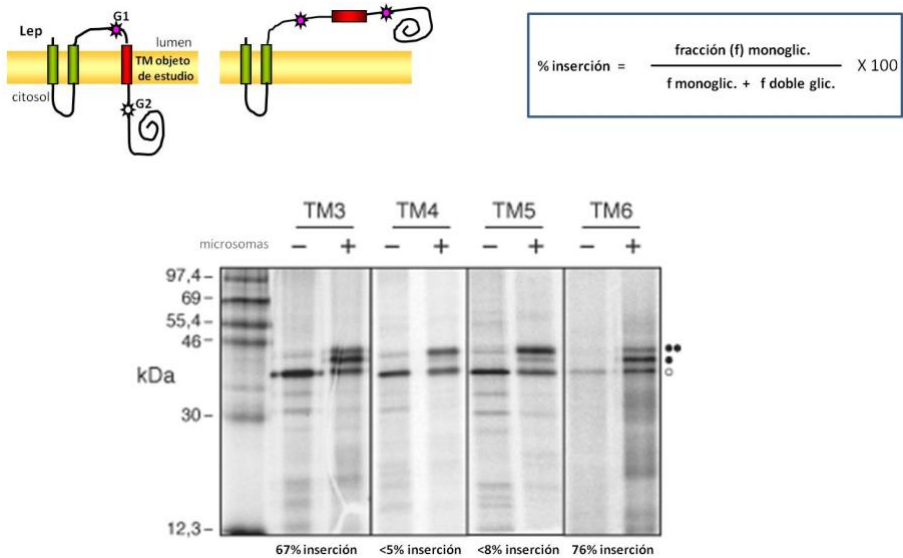
Varios de los segmentos TM de TRAM que hemos demostrado que atraviesan la membrana eficientemente en el contexto biosintético de la proteína contienen aminoácidos hidrofílicos o incluso cargados. Un análisis de los distintos segmentos transmembrana de TRAM utilizando el servidor *ΔG Predictor* (figura R2.D2) muestra que desde el punto de vista termodinámico que la integración de varios de los segmentos TM parece estar muy penalizada. De hecho, este programa predice que los fragmentos 3, 4, 5 y 6 (la mayoría de ellos contienen residuos cargados) no se integrarían eficientemente en la membrana. En este algoritmo, un valor positivo de  $\Delta G$  indica translocación mientras que un valor negativo es indicativo de inserción en la membrana. Para determinar si estos segmentos son capaces de insertarse en la membrana de forma independiente usamos el mismo sistema experimental utilizado para el desarrollo del *ΔG Predictor*, el cual se basa en la peptidasa del péptido señal de la membrana interna de *Escherichia coli* Lep (*leader peptidase*) (Hessa et al., 2005b). Lep está formada por dos segmentos TM (H1 y H2) conectados por un lazo citosólico (P1) y un dominio C terminal extracitosólico voluminoso (P2). Esta proteína es capaz de insertarse en membranas derivadas del RE con los dos extremos localizados en la parte luminal (Gafvelin et al., 1997).

	$\Delta G^{\text{pred}}$ (kcal/mol)
TM1: <sup>24</sup> ADIVSCLAMFLLLGLMFEVTA <sup>44</sup>	-0.63
TM2: <sup>80</sup> LATVLFYMLVAIIHAIQEYVL <sup>102</sup>	-1.24
TM3: <sup>124</sup> QLSAFYLFACVWGTFILIS <sup>142</sup>	+0.28
TM4: <sup>167</sup> FFYISQLAYWLHAFPELYF <sup>185</sup>	+4.03
TM5: <sup>197</sup> LVYIGLYLFHIAGAYLLN <sup>214</sup>	+1.05
TM6: <sup>218</sup> LGLVLLVLHYFVEFLFHISRLFY <sup>240</sup>	+0.77
TM7: <sup>252</sup> LWAVLFVLGRLLTLILSVLT VGF <sup>274</sup>	-1.11
TM8: <sup>293</sup> VLAVRIAVLASICITQAFMMWKFI <sup>316</sup>	-0.56

**Figura R2.D2. Predicción del  $\Delta G$  para la inserción en la membrana de los segmentos TM de TRAM.** El programa utilizado “ $\Delta G$  predictor” está accesible en internet (<http://dgpred.cbr.su.se/>). El algoritmo utilizado está basado en el ensayo *in vitro* descrito en la figura I.10. Los datos pueden expresarse como una constante de equilibrio aparente y ser convertidos a valores de energía libre aparente (Hessa et al., 2005b) para una comparación relativa entre las diferentes secuencias. En este sistema, un  $\Delta G$  aparente de 0 kcal/mol corresponde con una inserción del 50% de las moléculas (Hessa et al., 2007). Mientras que valores de  $\Delta G$  positivos (destacados en rojo) son indicativos de translocación, los valores negativos (números verdes) son indicativo de integración.

En el sistema utilizado el segmento objeto de estudio se subclona en el dominio P2 quedando flanqueado por dos dianas de glicosilación (G1 y G2) (figura R2.D3, panel superior). La monoglicosilación de la quimera indica integración mientras que moléculas doblemente glicosiladas son indicativas de la translocación del segmento estudiado. El porcentaje de inserción se calcula en base a las fracciones de moléculas [monoglicosiladas / (monoglicosiladas+doblemente glicosiladas)] x100. Con este sistema procedimos a estudiar la inserción de forma aislada de aquellos segmentos TM cuya predicción, en base a su secuencia, sugiere que no se integran en la membrana. La figura R2.D3 muestra los productos de traducción en

presencia de microsomas de cuatro constructos diferentes que contienen el TM3 (residuos 124-142), TM4 (residuos 167-185), TM5 (197-214) y el TM6 (residuos 218-240) de TRAM. El TM3, a pesar de tener un  $\Delta G$  positivo mostró aproximadamente un 67% de inserción, lo que quiere decir que este segmento es reconocido como un verdadero segmento TM por la maquinaria de inserción, a pesar de su baja hidrofobicidad. No ocurrió así para los TM 4 y 5 que son prácticamente translocados en su totalidad, indicando que fuera del contexto de su secuencia natural son incapaces de integrarse en la membrana y sugiriendo que su inserción debe ser asistida. Dado que más del 75% de las moléculas que contenían al TM6 fueron monoglicosiladas, esta secuencia es eficazmente reconocida por la maquinaria de integración como un TM legítimo, y, al igual que ocurría con el TM3 este sexto fragmento se inserta experimentalmente mucho mejor que lo predicho computacionalmente. Este mayor grado de inserción puede explicarse, al menos en parte, por la presencia de residuos cargados positivamente en el extremo C-t del TM6, que quedan orientados al lado citosólico de la membrana, ya que se ha descrito previamente que residuos cargados positivamente flanqueando regiones TM pueden mejorar la capacidad de inserción (Lerch-Bader et al., 2008), de acuerdo con la regla de “positivo dentro” (von Heijne, 1992) mencionada anteriormente.



**Figura R2.D3. Inserción independiente de los fragmentos TM marginalmente hidrofóbicos de TRAM.** Arriba se muestra un esquema de la construcción utilizada para estudiar la capacidad de inserción de determinadas secuencias en la membrana (Hessa et al., 2005a). G1 y G2 son las potenciales dianas de glicosilación representadas por los asteriscos que son rosas cuando se modifican por la OST y blancas cuando no son modificadas. Los rectángulos verdes representan el H1 y H2 de Lep mientras que el rectángulo rojo es la secuencia objeto de estudio insertada en el lazo luminal P2 de Lep. El porcentaje de inserción en este sistema se calcula como la cantidad de moléculas monoglicosiladas dividido por la suma de las moléculas monoglicosiladas más las doblemente glicosiladas y todo esto multiplicado por cien. En el panel inferior se muestran las traducciones de las quimeras ensayadas.

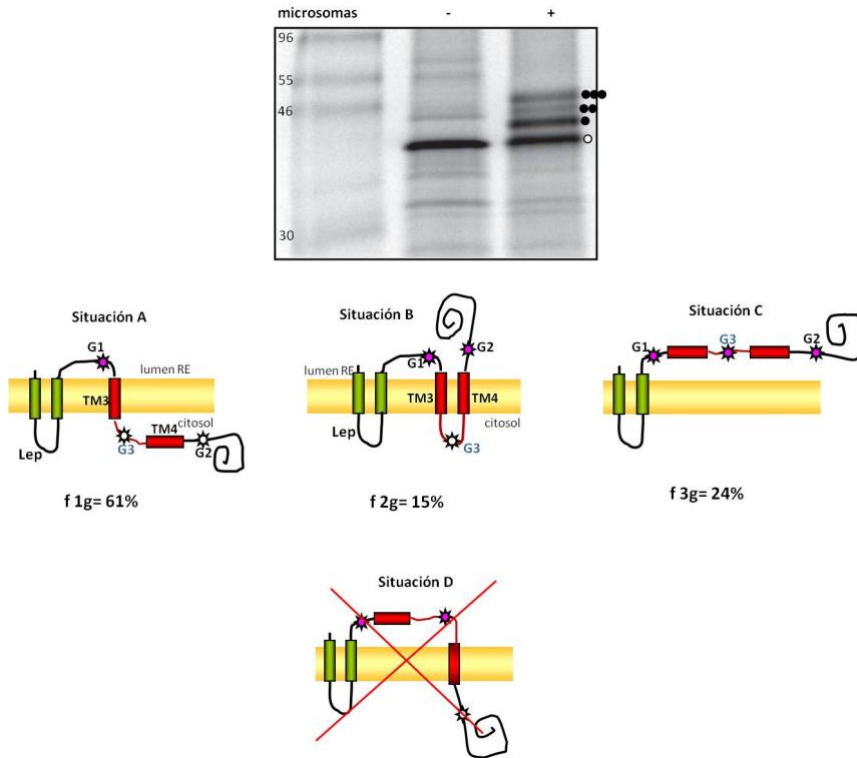
### R2.D2. Influencia de los segmentos TM adyacentes en la inserción de segmentos marginalmente hidrofóbicos.

Una vez observado que la inserción de los TM 4 y 5 no se puede justificar simplemente por un reparto pasivo desde el translocón a la membrana, se decidió estudiar la posibilidad de que otros segmentos TM con una información topológica más robusta pudieran asistir a la integración de

aquellos que carecían de la misma. Recientemente se ha descrito que en algunas ocasiones, los segmentos TM adyacentes, especialmente el precedente (Hedin et al., 2010), puede favorecer la inserción de segmentos marginalmente hidrofóbicos (Enquist et al., 2009).

Con objeto de estudiar si la integración en membranas del segmento TM4 está influenciada por la presencia del TM precedente clonamos en el mismo sistema de análisis la región que incluye ambos segmentos TM3 y TM4 (residuos 185-214) flanqueada por las dos dianas de glicosilación (G1 y G2) anteriormente mencionadas. La transcripción/traducción *in vitro* de esta quimera originó el patrón de bandas de glicosilación que se muestra en la figura R2.D4. Dado que esta construcción con dos TM foráneos puede dar lugar a diferentes formas topológicas teóricas, diseñamos una diana de glicosilación adicional en la región que conecta los dos segmentos TM (G3, figura R2.D4); lo que permite interpretar más fácilmente los patrones de las distintas formas glicosiladas obtenidas. La cuantificación de las bandas en las autorradiografías de los geles de electroforesis mostró un porcentaje de glicosilación del 24% de moléculas triplemente glicosiladas, correspondiendo esta población a las moléculas que presentan los dos fragmentos translocados al lumen del RE (figura R2.D4, situación C). La fracción de moléculas que sólo se glicosilaron en una de sus dianas (61%) se origina por la inserción de una sola de las hélices en la membrana mientras que la otra sería translocada (fig. R2.D4, situación A ó D). Sin embargo, la situación más probable es que sea el TM3 el que esté insertado y el TM4 translocado ya que el primero, cuando se ensayó independientemente, presentó un porcentaje de inserción del 67% mientras que el segundo sólo se integraba en un porcentaje <5% (figura R2.D3). Finalmente, el 15% del total correspondía a la población de moléculas doblemente glicosiladas procedente de la inserción de ambos fragmentos simultáneamente como una horquilla. Para poder asignar la contribución de la horquilla a la

integración en la bicapa lipídica de estos dos segmentos TM debemos analizar los datos mostrados en las figuras R2.D3 y R2.D4 conjuntamente.



**Figura R2.D4. Inserción de la región TM3+TM4 de TRAM en una variante del sistema Lep con tres dianas de glicosilación.** De forma análoga a la integración de un TM aislado (figura R2.D3), se introdujo dentro de Lep la región de TRAM que abarca desde la Gln 214 hasta la Phe 185 y que comprende los TM 3 y 4 y el lazo que los une. Para distinguir entre las posibles topologías se diseñó una diana de glicosilación adicional (G3) en el lazo que conecta los dos fragmentos TM. La figura muestra el resultado de la traducción *in vitro* de la quimera y las distintas situaciones topológicas posibles que puede adquirir. La situación D se ha desestimado ya que resulta muy improbable que el TM3 no se inserte y el TM4 sí lo haga por sí mismo, como se explica en el texto. El círculo blanco representa las moléculas sin glicosilar mientras que el negro es significativo de la modificación de una de las dianas.

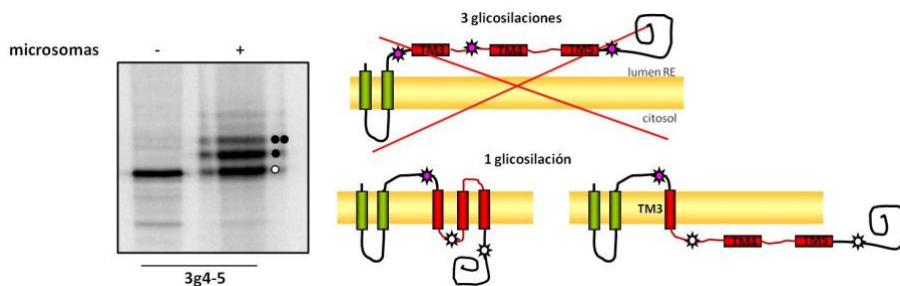
Según lo mostrado en la figura R2.D4, cuando se ensayan el TM3 y el TM4 conjuntamente el primero se inserta con una eficiencia del 76% (situación A + situación B), y el TM4 lo hace en un 15%, aproximadamente triplicando su inserción respecto al segmento aislado (<5%). Es interesante destacar que a su vez, también el TM3 mejora su eficiencia de integración en presencia de la horquilla (pasa de un 67% cuando se encuentra aislado a un 76% cuando se traduce junto con el TM4)

Probablemente, en el mecanismo de traducción de TRAM *in vivo* estos dos segmentos TM interaccionarán entre ellos durante el proceso de inserción cotraduccional para facilitar su ensamblaje mientras son embebidos en la bicapa lipídica (Tamborero et al., 2011). De hecho, ambos segmentos TM poseen aminoácidos que pueden formar puentes de hidrógeno e interacciones iónicas con otros residuos (E, N, Q e H) lo que posibilita la estabilización de la horquilla y el apantallamiento de estos grupos polares para su posterior integración en el entorno hidrofóbico de la membrana.

Con el objetivo de saber si esta región de TRAM se inserta en forma de horquilla o lo hace como un grupo de fragmentos TM que establecen interacciones entre ellos previamente a su inserción en la bicapa, realizamos otra serie de construcciones en este mismo sistema experimental. Para ello, en primera instancia se subclonó la región que abarca los TM 3, 4 y 5, en concreto desde el aminoácido 125 hasta el 213 de la secuencia de TRAM (ver figura R2.B1). Además, se añadió por mutagénesis dirigida una diana de glicosilación adicional en el lazo que une los TM 3 y 4 para facilitar la interpretación de los resultados (a esta construcción la llamamos 3g4-5). La figura R2.D5 muestra el resultado de la traducción en presencia de membranas de esta construcción. Observando los patrones de glicosilación obtenidos podemos descartar que los tres TM sean translocados al lumen simultáneamente, ya que no se observan moléculas triplemente glicosiladas (a diferencia de lo que ocurría en 3g4,



figura R2.D4). A pesar de que a partir de esta construcción no podemos concluir que los tres segmentos TM se integren como un grupo (la población de moléculas monoglicosiladas puede proceder de distintas formas topológicas, figura R2.D5) sí parece existir un efecto claramente favorecedor del TM5 sumado a los dos anteriores, ya que su presencia está impidiendo la translocación global de toda esta región.

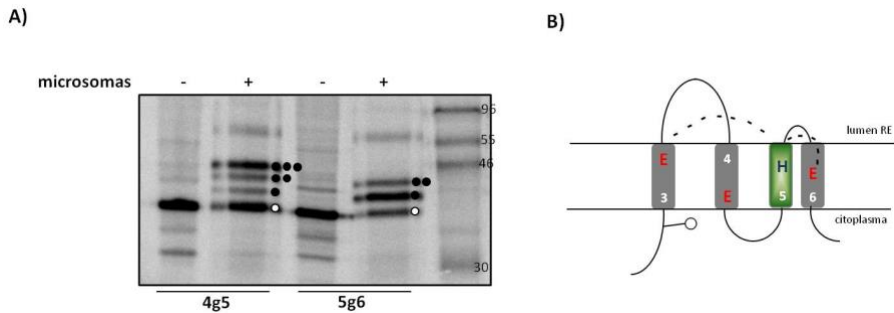


**Figura R2.D5. Diseccionando el proceso de integración cotraduccional de TRAM.**

Resultado de la traducción en presencia de membranas de la quimera Lep-3g4-5. A la derecha se muestran esquemas de las distintas formas topológicas que puede adoptar la quimera.

A continuación, se realizaron dos construcciones que contenían por una parte, la región que abarca el TM4 y el TM5 añadiendo una diana de glicosilación en la región que los conecta (4g5, aminoácidos 167-213) y, por otra, la región que abarca el TM5 y el TM6, de nuevo diseñando una diana de glicosilación entre los dos TMs (5g6, aminoácidos 197-240). Los resultados de las traducciones *in vitro* de estas proteínas quiméricas en presencia de membranas pueden observarse en la figura R2.D6a. Estos resultados muestran que, así como en el caso de la construcción 4g5 existen moléculas triplemente glicosiladas que indican que en una alta proporción los TM 4 y 5 han sido translocados al lumen, la ausencia de

formas triplemente glicosiladas es indicativa de que no existe translocación de los TM 5 y 6 de manera simultánea.



**Figura R2.D6. Diseccionando el proceso de integración cotraduccional de TRAM.**

A) Resultado de la traducción en presencia de membranas de las quimeras Lep4g5 y Lep5g6. B) Modelo de la disposición de los aminoácidos polares en los TM 3, 4, 5 y 6 de TRAM que proponemos como directores de la inserción en grupo de esta región de la proteína. Las líneas de trazos representan los potenciales puentes de hidrógeno que estabilizarían esta región de la proteína permitiendo su integración en bloque.

Estos resultados sugieren que el TM5 no debe tener un efecto significativo en favorecer la inserción del TM4 cuando estos dos TM se encuentran aislados de su entorno natural, es decir, en ausencia de la parte N-terminal de la proteína. Sin embargo, sí parece tener una contribución significativa para la inserción de los TM 3 y 4 cuando éstos son traducidos a la vez (figura R2.D5). Por lo que respecta a la horquilla 5g6, las moléculas monoglicosiladas solamente pueden deberse a la inserción del TM5 y translocación del TM6; la cuantificación de esta banda da un 72% de inserción del TM5, mucho mayor que cuando se ensayó este fragmento aislado, por lo que podemos decir que la presencia del TM6 incrementa la

eficiencia de integración del TM5, probablemente porque se establezcan interacciones entre aminoácidos polares de ambos TM.

Todos estos datos parecen indicar que la inserción de los TM 3, 4, 5 y 6 de TRAM se realiza, en cierta medida, de forma cooperativa, en grupo. El esquema del modelo que proponemos para la integración en bloque de esta región se muestra en la figura R2.D6b. En este modelo, una histidina (H206) del TM5 podría formar puentes de hidrógeno por una parte con un glutámico del TM3 (E143) y por otra con uno del TM6 (E230); estas interacciones disminuirían la polaridad neta de las regiones transmembrana y por tanto estabilizarían en gran medida su integración en la bicapa. Además, este modelo explicaría por qué en la horquilla 4g5 no se observa efecto cooperativo ya que a pesar de que el TM4 también posee un glutámico (E182), su localización no es la más idónea para que se pueda formar un puente de hidrógeno (ver la disposición de los aminoácidos en la figura R2.D6b). Así, interacciones electrostáticas entre TMs poco hidrofóbicos que contienen residuos polares o incluso cargados con fragmentos transmembrana más canónicos pueden favorecer la inserción de los primeros. En este sentido, como un perfeccionamiento que permite un mayor grado de sofisticación del propuesto por el modelo más simple (Blobel, 1980) que asumía el paso secuencial e independiente de los TM desde el canal del translocón a la membrana, las proteínas politópicas, entre ellas TRAM, pueden haber desarrollado estrategias variadas para la adquisición de su estructura tridimensional en la membrana. Muchas proteínas politópicas, como el CFTR (regulador del transportador de la fibrosis quística), la glicoproteína P, acuaporina (Pitonzo and Skach, 2006; Sadlish and Skach, 2004) y, en vista de los resultados obtenidos en la presente tesis, también TRAM (Tamborero et al., 2011), utilizan mecanismos diferentes al simple particionamiento secuencial e independiente de los fragmentos hidrofóbicos para adoptar su estructura terciaria en la membrana. Estos mecanismos alternativos existen,

probablemente, porque muchos segmentos TM, además de su acción como determinantes topológicos, poseen otras funciones para las que requieren la presencia de ciertos aminoácidos polares. La presencia de determinados residuos, como por ejemplo los aminoácidos cargados puede, en muchas ocasiones, comprometer la capacidad de inserción de un fragmento transmembrana. Es por ello que la evolución ha debido de generar diversas soluciones al problema que surge en la inserción de estas regiones introduciendo alternativas al mecanismo básico de inserción de fragmentos TM en la bicapa lipídica para acabar adquiriendo su estructura funcional.

La proteína TRAM ha sido relacionada previamente con los procesos de translocación e integración de algunas proteínas de secreción y de membrana (Cross and High, 2009; Do et al., 1996; Heinrich et al., 2000; Heinrich and Rapoport, 2003; McCormick et al., 2003; Sauri et al., 2007; Voigt et al., 1996). Aunque no se conoce cuál es su función en estos procesos, se ha descrito la interacción de TRAM con secuencias de hidrofobicidad limitada (Cross and High, 2009; Heinrich et al., 2000; Meacock et al., 2002; Voigt et al., 1996), por ello resulta una hipótesis atractiva la idea de que TRAM tenga una actividad chaperona de proteínas de membrana asistiendo a la integración en la bicapa lipídica de determinados segmentos, lo cual puede ser especialmente relevante en la integración de aquellos segmentos TM poco hidrofóbicos o incluso conteniendo residuos cargados.

La información topológica extraída en este trabajo sugiere un modelo para la función de TRAM en el que la presencia de secuencias transmembranales con hidrofobicidad limitada (TM3, TM4, TM5 y TM6) proporciona un lugar donde “se podría recibir” a los TM poco hidrofóbicos de las cadenas nacientes que están siendo sintetizadas, sirviendo como una zona de ensamblaje para esas regiones hidrofílicas antes de insertarse en la bicapa lipídica (Tamborero et al., 2011), a la espera de su interacción con otras

regiones del polipéptido naciente que faciliten este proceso. De hecho, esto mismo parece ocurrir en la inserción de algunos de sus propios TMs; como hemos mostrado, la inserción de los TM 4 y 5 extraídos de su contexto natural es defectuosa y tanto el TM que les precede como el que les sigue son requeridos para que se integren más eficazmente. Consistente con esta idea, un trabajo reciente muestra evidencias experimentales sobre cómo interacciones de lazos flanqueantes y de otros TM vecinos pueden permitir la integración de hélices extremadamente poco hidrofóbicas (Hedin et al., 2010).

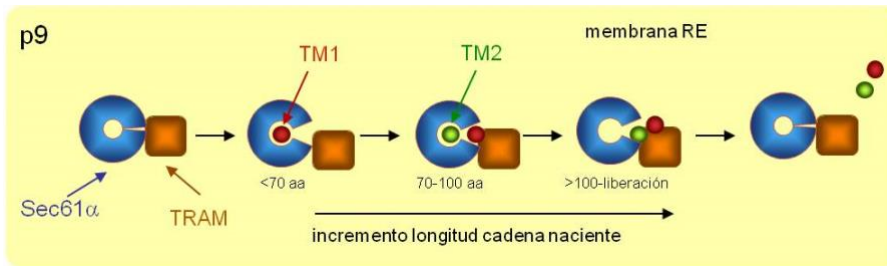
## **R2.E. REQUERIMIENTO DE TRAM DURANTE LOS PROCESOS DE INSERCIÓN EN LA MEMBRANA: INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TRAM MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA.**

La interacción de TRAM con fragmentos TM que están siendo integrados a través del translocón ha sido descrita en diversas ocasiones, pero nunca se ha estudiado si esta proteína es estrictamente necesaria durante estos procesos, por ello nos pareció interesante estudiar el requerimiento de TRAM en la integración de fragmentos TM mediante la técnica de RNA de interferencia o silenciamiento (siRNA).

La proteína de movimiento del virus del moteado del clavel p9, ha sido estudiada ampliamente en nuestro laboratorio durante el proceso de su inserción cotraduccionanal en la membrana del RE (Sauri et al., 2007; Sauri et al., 2005; Sauri et al., 2009; Vilar et al., 2002). Ésta es una proteína con dos segmentos TM que se inserta cotraduccionalmente en el RE con una topología N-t/C-t citosólica y que durante este proceso sus dos TMs se encuentran adyacentes a TRAM hasta que termina el proceso de inserción, cuando el peptidil-tRNA es liberado del ribosoma. La figura R2.E1 muestra

el modelo propuesto para la integración de p9 (Sauri et al., 2007). En este modelo, basado en experimentos de fotoentrecruzamiento de cadenas nascentes, los autores proponen que el TM1 de p9 no se aleja del translocón una vez ha salido del poro formado por Sec61 $\alpha$ , sino que permanece inteccionando con la subunidad  $\alpha$  del heterotrímico y con TRAM hasta que el TM2 abandona Sec61 $\alpha$  interaccionando con TRAM (al igual que TM1), de esta forma ambos segmentos TM deben particionar a la membrana a la vez.

Para estudiar si TRAM es necesaria en la correcta integración de p9 en la membrana del RE utilizamos una estrategia basada en la inhibición de la expresión de TRAM en células HeLa mediante la utilización de un RNA de interferencia o silenciamiento (siRNA) que bloquea la expresión de una parte importante de los RNAs mensajeros que codifican para esta proteína. Posteriormente se tratan las células con digitonina, detergente que solubiliza la membrana plasmática pero deja casi totalmente intacta la membrana del RE, consiguiéndose unas células semipermeabilizadas (células SP) que mantienen las interacciones proteína-proteína y por tanto el complejo del translocón funcional (Wilson and High, 2010; Wilson et al., 1995). Este sistema posee las ventajas de los sistemas “libres de células” convencionales, incluyendo su rapidez, pero con la posibilidad de poder manipular los componentes del ensayo. Las células SP mantienen los orgánulos intracelulares permitiendo que los procesos ocurran en el tubo de ensayo mimetizando en gran medida la situación de la célula intacta. Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio del profesor Stephen High de la Universidad de Manchester, Inglaterra.

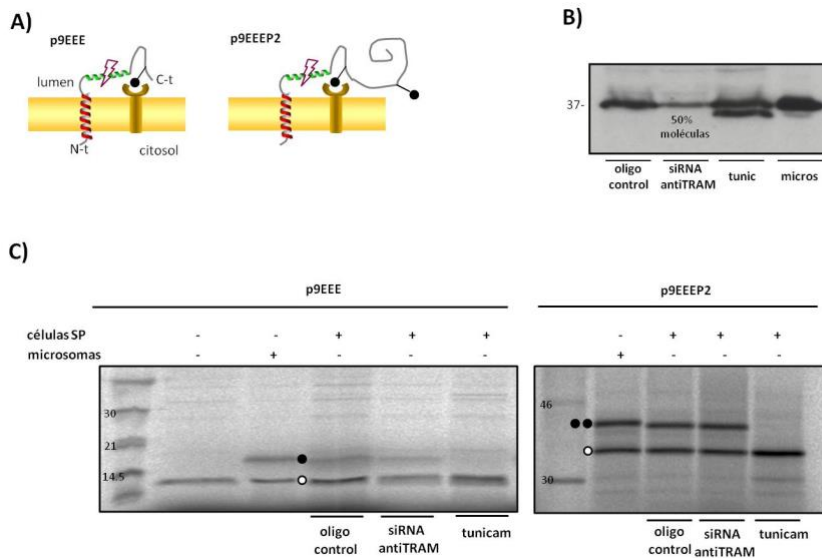


**Figura R2.E1. Modelo de integración cotraduccional de la proteína p9 del virus del moteado del clavel.** El TM1 de p9 es adyacente a Sec61 $\alpha$  durante todo el proceso, a una cierta longitud de cadena nascente este primer TM entrecruza con TRAM sugiriendo una transición de la cadena nascente a una interfase entre dos componentes del translocón (Sec61 $\alpha$  y TRAM). p9 sigue estando adyacente a TRAM cuando el TM2 entra en el translocón; a longitudes mayores de cadena nascente el TM2 también interacciona con TRAM. Ambos TM permanecen cercanos a TRAM hasta que finaliza el proceso de traducción. La membrana del RE está representada en naranja vista desde arriba. Tomado de Saurí et al., 2007.

Para detectar si una proteína se integra eficientemente en la membrana de células a las que se les ha disminuido la expresión de TRAM mediante el tratamiento con siRNA, utilizamos como marcador indicativo del proceso la modificación de dianas de glicosilación por la OST, cuya función también se mantiene intacta en estas células semipermeabilizadas. Para realizar estos experimentos utilizamos un mutante de p9 que posee tres glutámicos en mitad del segundo TM (p9EEE) (Vilar et al., 2002), de manera que éste segundo fragmento hidrofóbico pasa de integrarse en la membrana en la proteína salvaje a no hacerlo en el mutante (figura R2.E2a, izquierda), por lo que la diana de glicosilación que posee queda así accesible a la modificación por la OST y nos sirve como indicadora de la integración en presencia o en ausencia de TRAM. Los experimentos se realizaron en paralelo con células SP tratadas con un oligo control que no forma el complejo silenciador, con células SP tratadas con el siRNA antiTRAM y con microsomas de perro (como control de traducción). Los resultados de la integración de p9EEE

cuando el porcentaje de expresión de TRAM en presencia del siRNA es de aproximadamente el 50% (el porcentaje de inhibición de la expresión se valoró mediante transferencia a membrana de nitrocelulosa e inmunodetección con un anticuerpo antiTRAM) se muestran en la figura R2.E2. La banda de mayor movilidad electroforética corresponde a la proteína sin residuos de azúcares añadidos mientras que la de mayor movilidad corresponde a una modificación por glicosilación (en el caso de p9EEE, figura R2.E2c panel izquierdo) o dos (en el caso de p9EEEP2 (figura R2.E2c panel derecho). Para corroborar que las bandas de menor movilidad electroforética se debían, efectivamente, a modificaciones por adición de azúcares, en todos los experimentos siempre se realizó un control con tunicamicina, droga que inhibe a la OST impidiendo que transfiera azúcares a las secuencias consenso. Como se observa en la figura R2.E2c, los niveles de glicosilación no se ven afectados por lo que podemos decir que una disminución de aproximadamente la mitad del número de moléculas de TRAM presentes en la célula no parece afectar a la inserción en la membrana de p9. Utilizando las mismas células SP que para los experimentos de p9EEE, realizamos traducciones de otra construcción basada en ésta, ya que la eficiencia de glicosilación de este constructo es muy baja y podría ser que no se detectaran diferencias por encontrarse en el límite de sensibilidad de la técnica. p9EEEP2 consiste en la fusión de p9EEE al lazo extracitosólico P2 de Lep, que posee otra diana de glicosilación (figura R2.E2a, derecha). Alargando el extremo C-t del polipéptido conseguimos una proteína de mayor peso molecular que nos facilita la visualización en geles de SDS-PAGE. Los resultados corroboran los obtenidos con el constructo anterior (p9EEE), confirmando que, al parecer, no existen diferencias en la capacidad de inserción de esta proteína con los niveles de inhibición de la expresión de TRAM conseguidos.

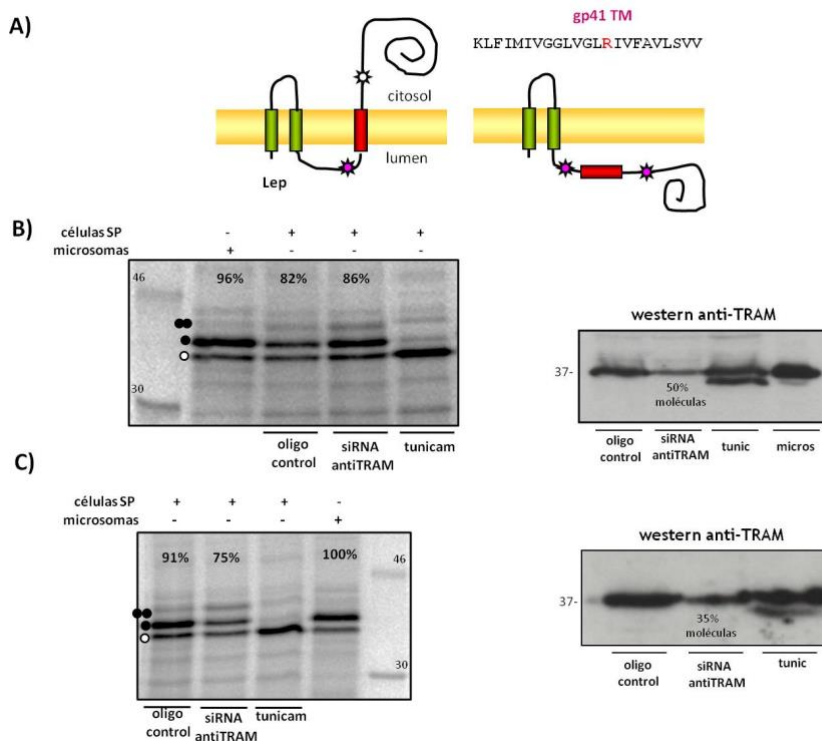




**Figura R2.D2. Requerimiento de TRAM para la inserción de p9 en la membrana del RE.** A) Esquema de las construcciones utilizadas. p9EEE posee tres E en el segundo TM lo que le impide integrarse correctamente en la membrana (indicado por el rayo). p9EEEE2 es la fusión de p9EEE a P2 de Lep y por ello posee una diana de glicosilación (bola negra) adicional. B) Transferencia e inmunodetección (western) anti-TRAM del extracto de células HeLa semipermeabilizadas (células SP). La primera carrera corresponde al cultivo celular transfectado con los oligonucleótidos control (*RISC free*) que no forman el complejo silenciador del mRNA. La segunda corresponde a las células tratadas con el siRNA anti-TRAM, la tercera corresponde a las células tratadas con tunicamicina (tunic) y la cuarta al western anti-TRAM realizado con microsomas (micros) como control de funcionamiento del anticuerpo. Se consiguió aproximadamente un 50% de inhibición de la expresión de TRAM en el cultivo tratado con el siRNA en cuestión. C) Traducción de los mutantes en presencia de lisado de reticulocitos, células SP como fuente de membranas de RE y metionina marcada con <sup>35</sup>S. El círculo blanco representa la población de moléculas no glicosiladas, el negro las monoglicosiladas y los dos negros las doblemente glicosiladas.

Varios de los TM descritos en la bibliografía que interaccionan con TRAM durante su integración en el RE poseen algún residuo cargado en su secuencia. De hecho, como ha sido comentado anteriormente, una de las

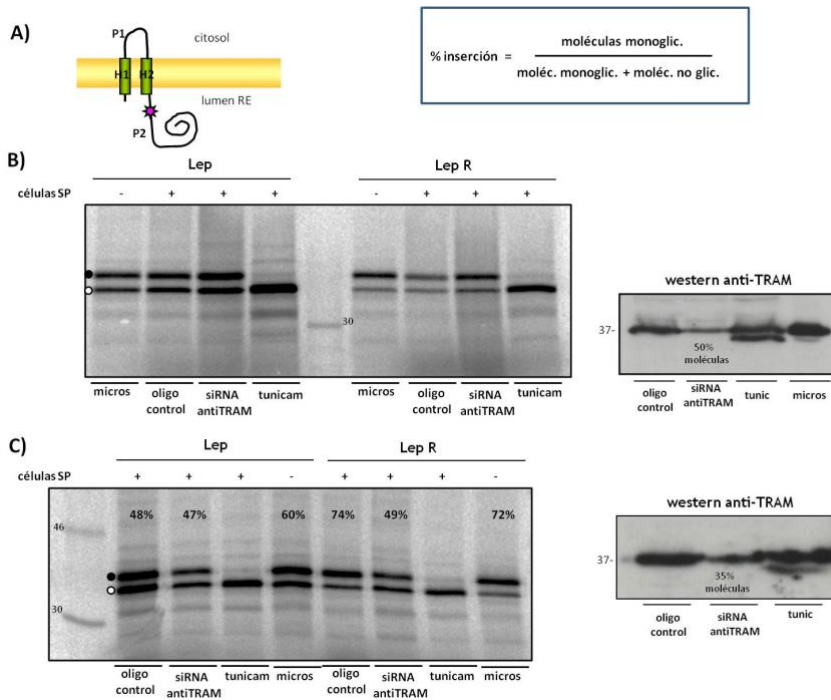
hipótesis sobre la función de TRAM es precisamente facilitar el paso de fragmentos TM poco hidrofóbicos desde el canal acuoso del translocón hasta la bicapa lipídica, actuando como una especie de receptor previo a la integración en la membrana de estas secuencias. Por ello nos pareció interesante estudiar el requerimiento de TRAM durante la integración en la membrana del RE de este tipo de secuencias. Uno de los segmentos TM que presentan residuos cargados en su región hidrofóbica, que ya ha sido objeto de estudio en esta tesis, es el de la proteína gp41 del VIH (figura R2.E3a). Cuando la inhibición de la expresión de TRAM significaba solamente un 50% de las moléculas presentes en la célula no se observaron diferencias en la inserción con respecto a células no tratadas (figura R2.E3b). Sin embargo, al reducir la expresión de TRAM hasta un 35%, sí se observó una disminución en el porcentaje de moléculas glicosiladas en un 16% (figura R2.E3c). Estos resultados indican que para observar algún efecto en la integración de este segmento TM la expresión de TRAM debe ser reducida significativamente. Sin embargo, no fuimos capaces de conseguir niveles de inhibición superiores al 65%, que podrían revelar efectos más drásticos, ya que al aumentar la concentración del RNA de interferencia las células morían.



**Figura R2.E3. Requerimiento de TRAM para la inserción en la membrana del RE de secuencias con residuos cargados: TM de gp41.** A) Esquema de las construcciones utilizadas. El TM de gp41 se introdujo en el lazo P2 de Lep, quedando flanqueado por dos sitios de glicosilación. El porcentaje de inserción se calcula como [%moléculas monoglicosiladas / (moléculas monoglicosiladas + moléculas doblemente glicosiladas)] x100. B) Resultado de las traducciones en células semipermeabilizadas y porcentajes de inserción en presencia y en ausencia de un 50% de las moléculas de TRAM (ver western blot, derecha). C) Porcentaje de moléculas insertadas en la membrana cuando se disminuyó la expresión de TRAM aproximadamente a un 35% (ver western, derecha).

Con objeto de extender estos estudios se diseñaron otras secuencias con residuos cargados en la región hidrofóbica. Así, observamos un efecto parecido en la inserción en la bicapa lipídica de un mutante de la proteína Lep (figura R2.E4). Heinrich et al. describieron en el año 2000 que durante

la inserción del primer segmento TM de Lep (H1) en el RE no existía interacción con TRAM, sin embargo, al introducir un residuo de arginina en medio del H1 esta región entrecruzaba con TRAM.



**Figura R2.E4. Requerimiento de TRAM para la inserción en la membrana del RE de la proteína Lep y del mutante Lep R.** A) Esquema de la construcción utilizada. En el mutante Lep R se sustituyó la A en posición 13 (mitad del H1) por una R. La estrella representa una diana de glicosilación. El porcentaje de inserción se calcula como % moléculas monoglicosiladas / (% moléculas monoglicosiladas + % moléculas no glicosiladas). B) Resultado de las traducciones en células semipermeabilizadas y porcentajes de inserción en presencia y en ausencia de un 50% de las moléculas de TRAM (ver western, derecha). C) Porcentaje de moléculas insertadas en la membrana cuando se disminuyó la expresión de TRAM aproximadamente a un 35% (ver western, derecha).

Por ello introdujimos la misma mutación en la secuencia nativa de Lep y estudiamos el requerimiento de TRAM mediante siRNA en la integración en la membrana del RE de la proteína nativa y de un mutante con una R en mitad de su primer TM. No obtuvimos diferencias en la inserción de la proteína Lep silvestre cuando se inhibía la expresión de TRAM, aunque sí en el mutante que posee la R en la mitad del primer TM. Cuando la expresión de TRAM se redujo aproximadamente a un 35% Lep R disminuía su inserción en la membrana de las células SP en un 25%, resultado similar a lo ocurrido con el TM de gp41. La razón por la que con una inhibición del 50% de las moléculas de TRAM no se observa una disminución en la eficiencia de integración de los TM estudiados puede ser debido a que quizá TRAM sea más abundante en la membrana del RE que el heterotrímero Sec61, al igual que ocurre con su supuesto homólogo funcional bacteriano YidC (Driessen, 1994; Urbanus et al., 2002), por ello, aunque se reduzca a la mitad la cantidad de TRAM presente en la célula, el exceso al que se encuentra permitiría cubrir los requerimientos para la inserción en la bicapa de este tipo de fragmentos.

Estos resultados proporcionan la primera aproximación experimental para el estudio de la función de TRAM como posible chaperona de proteínas de membrana ya que, hasta la fecha, solamente existían datos de entrecruzamiento con cadenas nacies de segmentos TM de diversas proteínas (datos que simplemente demuestran que TRAM se encuentra cerca, pero no que sea requerida para el proceso de inserción en la bicapa lipídica). Tanto el primer TM de Lep R como el TM de gp41 poseen una característica en común que es la presencia de un residuo cargado, por lo que los resultados presentados en este apartado de la tesis doctoral sugieren que TRAM podría estar participando activamente en el proceso de inserción de regiones TM poco hidrofóbicas que contengan residuos aminoacídicos cargados. Además, los indicios obtenidos de que

probablemente TRAM sea mucho más abundante que Sec61 $\alpha$  nos hace especular acerca de si este componente de la maquinaria de translocación/integración celular pudiera encontrarse en otro estado diferente, no asociado al heterotrímero Sec61. La proteína bacteriana YidC, que es mucho más abundante que SecYEG (homólogo del Sec61 $\alpha\beta\gamma$  eucariota), se encuentra tanto asociado al translocón formando un complejo con él como de forma aislada participando en la denominada ruta independiente de Sec en la que YidC actúa por sí misma como insertasa siendo responsable de la integración en la membrana de ciertas proteínas propias de procariontes así como de varias proteínas pequeñas pertenecientes a bacteriófagos (Facey et al., 2007; Samuelson et al., 2000; Serek et al., 2004; van der Laan et al., 2004; van der Laan et al., 2003). La hipótesis de que probablemente TRAM pueda tener funciones parecidas a las descritas para YidC junto con la observación derivada de los experimentos de siRNA realizados en el presente trabajo de que quizá TRAM sea mucho más abundante que Sec61 $\alpha$  abre las puertas a futuras investigaciones para dilucidar si esta proteína es capaz de actuar en un estado independiente, no asociado al núcleo del translocón, sino como una insertasa capaz de catalizar la integración de ciertas proteínas de membrana por sí misma.

# CONCLUSIONES

---

### **Respecto al plegamiento en el túnel de salida del ribosoma:**

1. Las hélices<sup>TM</sup> adquieren cierto tipo de compactación cuando se encuentran, todavía, dentro del túnel de salida de la subunidad grande del ribosoma. Por el contrario, aquellos fragmentos helicoidales pertenecientes a proteínas no transmembranales no adquieren esta compactación en el túnel.
2. Los determinantes que rigen esta compactación son la hidrofobicidad del segmento, la tendencia a la helicidad de los aminoácidos constituyentes del fragmento en cuestión y la longitud de la secuencia hidrofóbica. Además, parece haber un cierto sesgo en los aminoácidos presentes en una de las caras de la putativa hélice que favorecen esta compactación.
3. Las secuencias que se pliegan en el interior ribosomal permanecen plegadas en el canal del translocón, previamente a su inserción en la bicapa lipídica.

### **Respecto a la caracterización y función de TRAM:**

1. TRAM se integra en la membrana del RE a través del translocón mediante un mecanismo cotraduccional en el que participan la SRP, Sec61 $\alpha$  y la propia TRAM. Además, la TRAM endógena es necesaria para que las moléculas de TRAM que se están insertando en la membrana lo hagan adquiriendo la topología correcta.
2. TRAM presenta 8 fragmentos TM y adquiere una topología N-t/C-t citosólica, siendo modificada cotraduccionalmente por la OST en la primera (N<sub>56</sub>VT) de sus tres potenciales secuencias consenso de glicosilación que posee.
3. Probablemente, los TM 3, 4, 5 y 6 se integren como un grupo en la membrana, requiriendo que se den interacciones entre ellos previamente a su paso a la bicapa lipídica.



4. TRAM es requerida durante el proceso de inserció de fragmentos TM que poseen residuos con carga neta positiva

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## **M1. MATERIAL BIOLÓGICO.**

### **M1.A. MANIPULACIÓN DE LA BACTERIA *Escherichia coli*.**

#### **Cepas**

En este trabajo hemos empleado principalmente dos cepas diferentes de *E. coli* para la amplificación de DNA plasmídico. La cepa DH5 $\alpha$  (genotipo: F-end A1 hsd R17 (rk-, mk-) sup E44 thi-1 l- rec A1 gyr A96 rel A1 D (arg F- lac ZYA) U 169 y80d lacZDM15) se utilizó para la transformación rutinaria de DNA plasmídico. La cepa JM110 (genotipo: rpsL (Strr) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44  $\Delta$  (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZDM15]) fue utilizada durante los procesos de clonación en aquellas ocasiones que era necesario amplificar plásmidos no metilados para su posterior corte con enzimas de restricción sensibles a la metilación (ej., *Bcl*I). Las células competentes de ambas cepas se prepararon en el laboratorio siguiendo el protocolo de Sambrook de 1989.

#### **Condiciones de crecimiento**

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio LB (Luria Bertani) líquido [triptona 1% (p/v) (Pronadisa, Madrid, España), extracto de levadura 0.5% (p/v) (Pronadisa), NaCl 1% (p/v)] o sólido, añadiendo 2% (p/v) de agar bacteriológico (Pronadisa). Los medios se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión y 121°C. El LB se suplementó con el antibiótico apropiado en cada caso. Las células se crecieron a 37°C y 250 rpm.

### **Transformación por choque térmico**

Para introducir nuestros plásmidos de interés dentro de las cepas de *E. coli* se incubaron en hielo 10 ng de DNA junto con 50  $\mu$ l de células competentes durante 30 minutos. Tras este periodo las células se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos y posteriormente se incubaron 5 min. en hielo. Seguidamente se añadieron 500  $\mu$ l de LB y se recuperaron las células a 37°C durante 45 minutos en agitación. Las células se recogieron por sedimentación a 3000 rpm durante 5 min., se eliminaron 450  $\mu$ l del sobrenadante, con el resto se resuspendió el sedimento y se sembró en una placa LB con el antibiótico adecuado en cada caso. La placa se creció en una estufa a 37°C durante toda la noche.

### **Transformación por choque eléctrico.**

En aquellas ocasiones que se requería una alta eficiencia de transformación se recurrió a la transformación de DNA por medio de electroporación. En este caso 50  $\mu$ L de células electrocompetentes se incubaron con 5 ng de DNA plasmídico. A continuación las células fueron sometidas a un choque eléctrico de 1.8 kV/cm<sup>2</sup> durante 5 mili segundos, para lo cual se emplearon cubetas de electroporación con una distancia entre los electrodos de 0.1 cm. Tras el choque eléctrico las células se recuperaron en medio LB incubándolas 45 minutos a 37°C en agitación, pasados los cuales las células fueron sembradas en una placa de LB más el antibiótico requerido en cada caso.

## **M1.B. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS.**

### **Líneas celulares utilizadas.**

En este trabajo hemos utilizado dos tipos diferentes de líneas celulares de humanas que crecen en monocapa adheridas a un sustrato. La línea HEK293 (células embrionarias de riñón) se empleó durante los experimentos de topología de TRAM *in vivo*. Los estudios funcionales de TRAM con RNA de interferencia se realizaron con células HeLa (células epiteliales de carcinoma de cérvix) (ATCC).

### **Condiciones de crecimiento y propagación.**

Las líneas celulares se cultivaron en monocapa en frascos de 75cm<sup>2</sup> recubiertos con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*) con 4.8 g/L de glucosa suplementado con 2 mM glutamina y un 10% (v/v) de suero bovino. Cuando las células alcanzaban el 90% de confluencia se tripsinizaban y se pasaba una dilución a otros frascos conteniendo DMEM fresco con el objetivo de propagar la línea.

### **Transfección de DNA plasmídico y de siRNA.**

#### Transfección de DNA plasmídico

Un día antes de la transfección se procedió a pasar las células a una placa de 10 cm haciendo una dilución de manera que como mínimo tenga un 80% de confluencia el día en que se realice la transfección. A la mañana siguiente se mezclaron 18 µl de lipofectamina (Invitrogen) con 360 µl de DMEM sin suero y sin antibióticos; en un tubo separado se mezclaron 10 µg del DNA plasmídico con 360 µl de medio sin suero y sin antibióticos. Se dejó incubar ambas mezclas a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se juntaron ambos tubos en uno y la mezcla se incubó durante

20 minutos a temperatura ambiente. Se cambió el medio de la placa por 10 ml de DMEM sin suero y sin antibióticos y se añadió la mezcla de DNA+lipofectamina. Se incubó la transfección durante 6 horas a 37°C, tras este tiempo se eliminó el medio que fue reemplazado por 10 ml de DMEM+ suero+antibióticos. Las células se dejaron crecer durante toda la noche previamente al análisis de los efectos de la sobreexpresión.

#### Transfección de siRNA

Un día antes de la transfección se pasaron las células a una placa de 10 cm de diámetro usando una dilución tal que el día de la transfección tenía aproximadamente un 30% de confluencia. A la mañana siguiente se mezclaron en un tubo 30 µl de oligofectamina (Invitrogen) con 70 µl de medio Optimem (GIBCO) y en un tubo adicional el oligo dúplex con 375 µl de Optimem (el oligo dúplex tiene que quedar a una concentración en la placa de 100mM, aunque previamente debe hacerse un estudio para determinar la concentración del oligo óptima a la que se consigue el porcentaje de inhibición deseado para cada gen). Se incubaron ambas mezclas 5 minutos a temperatura ambiente. Ambos tubos se juntaron incubando la mezcla a temperatura ambiente 20 minutos. El medio de la placa fue sustituido por 7 ml de Optimem al que se le añadió la mezcla de transfección, que se incubó a 37°C durante 4-5 horas. Tras este periodo se eliminó el medio de transfección reemplazándolo por 10 ml de DMEM+suero+antibióticos. Para observar el efecto de la inhibición de la expresión del gen en cuestión se crecieron las células que habían sido transfectadas durante dos días antes de tripsinizarlas.

## **M2. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE DNA.**

### **M2.A. OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.**

Para el aislamiento de plásmidos de *E. coli* a pequeña escala se utilizó un sistema de DNA plasmídico comercial (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen, Hilden, Alemania).

Para la extracción de grandes cantidades de plásmido con el objetivo de transfectar después ese DNA en células de mamífero en cultivo se utilizó el kit comercial Plasmid Maxi de Qiagen.

### **M2.B. AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE PCR.**

Las reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler (Hamburgo, Alemania). Las mezclas de reacción contenían 0.1-1 ng de DNA molde, 1  $\mu$ M de cada oligonucleótido (Isogen, Maarsen, Holanda), dNTPs 0.25 mM, tampón de PCR comercial,  $MgCl_2$  1.5 mM y 1 unidad de Taq (*Thermus aquaticus*) polimerasa de Promega (Madison, WI, U.S.A.), para un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l. El programa de ciclos empleado rutinariamente es el siguiente: 2 min. de desnaturalización inicial a 95°C, 30 ciclos de amplificación (30 s. a 95°C, 1 min. a 55°C para la hibridación de los oligos al DNA molde, 1 min. a 72°C para la elongación) y una extensión final de 10 min a 72°C. El DNA amplificado se purificó mediante el sistema de purificación de productos de PCR (QIAquick PCR purification kit Qiagen).

## **M2.C. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.**

Se utilizó el sistema comercial *PCR mutagenesis kit QuikChange* de Stratagen. Las reacciones contenían 5-50 ng de DNA molde, 125 ng de cada uno de los oligonucleótidos diseñados con el cambio introducido, dNTPs 25mM y 1 unidad de DNA polimerasa Pfu (*Pyrococcus furiosus* Turbo en tampón comercial en un volumen final de 50  $\mu$ l. Se realizaron 18 ciclos de amplificación en un termociclador Eppendorf Mastercycler (30 s. a 95°C, 1 min. a 55°C y 2 min/kb de plásmido a 68°C precedidos por un ciclo de desnaturalización inicial de 2 min. a 95°C. El DNA amplificado se digirió con la enzima *DpnI* para degradar el DNA molde metilado y a continuación se transformaron células competentes DH5 $\alpha$  de *E. coli* con 3  $\mu$ l del producto obtenido. Las células se sembraron en placas de LB seleccionando con el antibiótico apropiado y se dejaron crecer toda la noche. Las mutaciones se confirmaron por secuenciación del DNA plasmídico.

## **M2.D. REALIZACIÓN DE CONSTRUCCIONES: DIGESTIÓN DE DNA Y LIGACIÓN.**

Para la realización de las construcciones empleadas en este trabajo tanto los insertos (obtenidos por PCR como los vectores fueron digeridos con las enzimas de restricción adecuadas siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de ligación se realizaron con una relación molar inserto vector 3:1 y 1 unidad de T4 DNA ligasa de Promega, la mezcla de ligación se incubó durante una noche a 16°C. El producto de ligación se transformó en células DH5 $\alpha$  que se sembraron en placas de LB seleccionando con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C durante toda la noche. La obtención de las construcciones fue comprobada mediante secuenciación.



El codón ámbar para situar el aminoacil-tRNA fotoactivable fue introducido posteriormente por mutagénesis dirigida en la posición 34 de la secuencia aminoacídica de TRAM (TAG34).

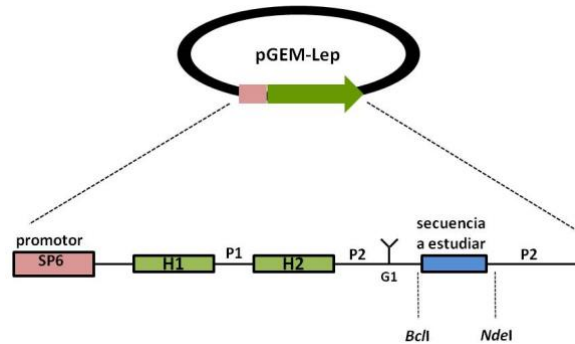
## **M2.E. SECUENCIACIÓN DE DNA.**

Las mutagénesis dirigidas y las construcciones realizadas fueron comprobadas por el servicio de secuenciación de MacroGen Inc. (Seoul, Korea).

## **M3. VECTORES Y DISEÑO DE CONSTRUCCIONES.**

### **M3.A. CONSTRUCCIONES PARA ESTUDIO DE PLEGAMIENTO DE CADENAS NACIENTES.**

Para los estudios de plegamiento en el túnel ribosomal se utilizó el plásmido pGEM-Lep (Prof. von Heijne, Universidad de Estocolmo, Suecia). En este vector la proteína Lep se encuentra bajo el promotor del bacteriófago SP6, las secuencias objeto de estudio fueron subclonadas mediante digestión con *BclI* y *NdeI* dentro del dominio P2 de esta proteína de *E. coli* (figura M3.A). La asparagina de la diana de glicosilación (G1) se encuentra a 36 aminoácidos del sitio de corte *BclI*, en los plásmidos derivados de éste para el estudio de la compactación en el vestíbulo de salida del ribosoma y en el translocón esta N se encuentra a 27 y 14 aminoácidos de *BclI*, respectivamente.



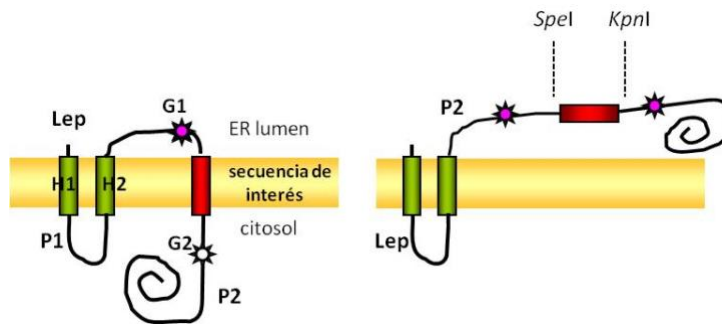
**Figura M3.A. Plásmido utilizado para estudiar plegamiento de cadenas nacientes en el interior del ribosoma.** El plásmido pGEM-Lep contiene la proteína Lep bajo el promotor SP6. H1 y H2 representan los dos TM que posee Lep, P1 y P2 el lazo citosólico y luminal respectivamente. G1 es una diana de glicosilación. Las secuencias de interés fueron subclonadas dentro de P2 de manera que a d P-NST comprendidas entre 63 y 73 la región objeto de estudio queda atrapada en una zona situada a unos 20-25 Å del sitio P (Mingarro et al., 2000; Whitley et al., 1996).

Para realizar los experimentos de transcripción/traducción de cadenas nacientes truncadas, se obtuvo por PCR la secuencia de la cadena naciente de longitud deseada utilizando un oligo directo que hibrida en la región 5' del promotor de SP6 y uno reverso cuyo extremo 5' hibrida en el último aminoácido que queremos que sea traducido, así al transcribir *in vitro* los productos de esta PCR generaremos mRNAs que carecen de codón de parada (mRNAs truncados).

Sobre este vector se realizaron todas las subclonaciones y mutantes utilizados para el estudio de la compactación de secuencias en el túnel ribosomal.

### M3.B. CONSTRUCCIONES PARA ESTUDIAR LA CAPACIDAD DE INSERCIÓN EN MEMBRANAS.

El vector principalmente empleado en los estudios de inserción en la bicapa lipídica se deriva del descrito en el apartado anterior (pGEM-Lep), pero en este caso presenta una diana adicional de glicosilación tras el segmento objeto de estudio (G2) (Hessa et al., 2005a; Hessa et al., 2007) y los sitios de restricción que flanquean la secuencia de estudio son, en este caso, *SpeI* y *KpnI* (figura M3.B). En este plásmido fueron subclonadas las regiones helicoidales de L9, NAGK, el TM de gp41 y el TM de la proteína G del VSV con respecto al capítulo de plegamiento en el túnel ribosomal, así como los fragmentos TM 3, 4, 5 y 6 de TRAM además de diversas combinaciones de los mismos.



**Figura M3.B. Plásmido utilizado para estudiar capacidad de inserción en membranas.**

En este caso dos dianas de glicosilación flanquean a la secuencia de interés, G1 y G2 (Hessa et al., 2005a).

### M.3.C. SISTEMAS UTILIZADOS PARA LA EXPRESIÓN DE TRAM.

#### Clonación de TRAM a partir de cDNA de ratón.

La secuencia nucleotídica de TRAM se amplificó por PCR a partir de cDNA de ratón utilizando el oligonucleótido directo 5'-ATGGCGATTCGCAAGAAGAGC-3' y el oligonucleótido reverso 5'-CTAAGAAGACTTCTCTTCTCCTGC-3'. Después de su purificación, el producto de PCR se introdujo en el plásmido comercial pGEM-T SP6 vector system de Promega, quedando la secuencia proteica bajo el promotor del fago SP6, lo que nos permitió la expresión *in vitro* de TRAM.

#### Vector para la expresión de TRAM en cultivos de células humanas.

Para poder expresar TRAM en cultivos celulares subclonamos su secuencia completa en el vector de transfección pCDNA3.1/V5-His TOPO-TA de Invitrogen. La secuencia que codifica para la proteína queda así bajo el promotor constitutivo de citomegalovirus (CMV) con las etiquetas del epítipo V5 y una cola de 6 histidinas en el extremo C-t para facilitar su detección.

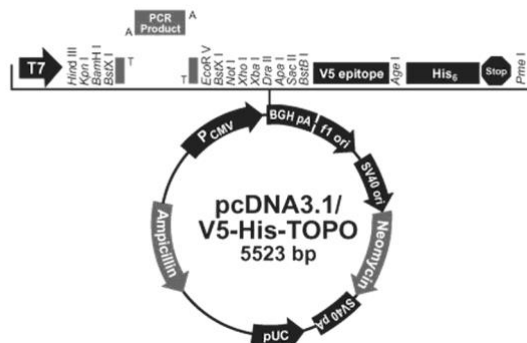
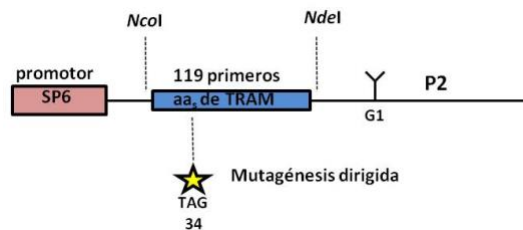


Figura M3.C. Mapa del vector pcDNA3.

### M3.D. PLÁSMIDO PARA LOS EXPERIMENTOS DE FOTOENTRECruzAMIENTO DE TRAM Y DE INSERCIÓN DE LA PROTEÍNA p9 EN CÉLULAS CON LA EXPRESIÓN DE TRAM AFECTADA.

En estos casos utilizamos el plásmido pGEM-P2 (Prof. von Heijne, Universidad de Estocolmo, Suecia) que contiene el promotor de SP6 fusionado únicamente al dominio P2 de Lep. En este plásmido subclonamos la secuencia que contiene hasta el aminoácido 119 de TRAM quedando esta región fusionada a P2. Un esquema de la construcción se muestra en la figura M3.D. La construcción p9EEE-P2 utilizada en el apartado R2.C. también está hecha sobre este vector y ya ha sido descrita previamente a este trabajo(Sauri et al., 2005).



**Figura M3.D. Plásmido utilizado para los experimentos de fotoentrecruzamiento.** El codón ámbar fue introducido mediante mutagénesis dirigida posteriormente a la subclonación de la región que contiene los 119 primeros aminoácidos de TRAM por restricción (*NcoI* y *NdeI*) en pGEM-P2.

## **M4. TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN *IN VITRO*.**

### **M4.A. TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*.**

Para las transcripciones *in vitro* se utilizó el sistema RiboMAX large scale RNA production system-SP6 de Promega (Madison, WI, U.S.A.). Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 25  $\mu$ l y contenían una mezcla de NTPs 25mM, 1  $\mu$ g de DNA y 2.5  $\mu$ l de RNA polimerasa proporcionada por el kit comercial. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 2 h. El mRNA sintetizado se purificó con el sistema de purificación de RNA de Qiagen (RNeasy clean up kit) y fue visualizado en geles de agarosa

### **M4.B. TRADUCCIÓN *IN VITRO*.**

Los mRNAs obtenidos se tradujeron *in vitro* en presencia de 10  $\mu$ l de extracto de lisados de reticulocitos (Promega), que proporciona la fuente de ribosomas y el resto de componentes celulares necesarios para la traducción, 0.5  $\mu$ l de una mezcla de aminoácidos excepto metionina, 1  $\mu$ g de mRNA, 1  $\mu$ l de membranas microsomales derivadas de retículo endoplásmico de páncreas de perro (Promega) y 0.2  $\mu$ Ci de metionina marcada con  $^{35}\text{S}$  (Perkin Elmer). La mezcla se incubó a 30°C durante 2 h.

### **Ensayo de inserción co/post traduccional.**

Para los estudios de inserción cotraduccional o posttraduccional en membranas de la proteína TRAM, el DNA plasmídico fue transcrito *in vitro* empleando la RNA polimerasa del fago SP6. El mRNA fue traducido durante 2 horas a 30°C en lisado de reticulocitos en presencia de metionina marcada con  $^{35}\text{S}$ , mezcla de aminoácidos sin metionina y microsomas en los

experimentos de inserción cotraduccional, tal y como acabamos de describir. En los ensayos de inserción posttraduccional las mezclas de traducción se incubaron en paralelo en ausencia de membranas (2 horas) para, tras haber inhibido la traducción empleando cicloheximida 3 mM durante 10 min a 26°C, añadir los microsomas. Las muestras se incubaron con los microsomas durante 1 hora para permitir la translocación antes de proceder a la sedimentación de membranas mediante ultracentrifugación.

### **Traducción de mRNAs truncados (sin codón de parada).**

Para la traducción de las cadenas nacientes truncadas en los experimentos de plegamiento en el ribosoma, la cantidad de mRNA que se añadió fue de 0.3 µg y la mezcla de traducción se incubó 45 min. Tras finalizar la traducción se añadió cicloheximida 3mM para generar intermediarios estables de traducción.

### **Traducción utilizando extractos celulares de germen de trigo.**

En los experimentos de fotoentrecruzamiento (ver en páginas sucesivas) y en el estudio de la dependencia de la SRP en el proceso de direccionamiento a la membrana de TRAM (apartado R2.B2), se usó como sistema de traducción, extracto de germen de trigo, en lugar del lisado de reticulocitos usado rutinariamente. A efectos prácticos, la característica que diferencia a ambos sistemas es que el germen de trigo contiene una menor cantidad de SRP (Kanner et al., 2002) por lo que, si el direccionamiento de la proteína en cuestión es dependiente de la misma, es necesario añadir este componente exógenamente. Las mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 15 µl que contenía 5 µl de germen de trigo (tRNA probes, Texas, U.S.A.), 0.45 µl de una mezcla de aminoácidos menos

metionina, 1  $\mu\text{g}$  de mRNA, 0.8  $\mu\text{l}$  de microsomas (tRNA probes, Texas, U.S.A.), SRP purificada 20mM (Prof. Arthur Johnson, College Station, Texas, U.S.A.) y 0.2  $\mu\text{Ci}$  de  $^{35}\text{S}$ -Met, dejando la mezcla incubarse a 26°C durante 1 h. Para que la traducción y el direccionamiento a la membrana sean efectivos en la mezcla de traducción debe tener un contenido en HEPES de 14.5mM, 56mM KOAc y 3.3 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ .

### **Traducción utilizando células semipermeabilizadas (SP) como fuente de membranas derivadas del RE.**

Para el estudio del efecto de la reducción de la expresión de TRAM mediante siRNA (apartado M.1.B) en el proceso de integración de diversos polipéptidos en la bicapa lipídica se realizaron traducciones *in vitro* donde se añadieron 2  $\mu\text{l}$  de células SP ( $1 \times 10^5$ , apartado M.6) como fuente de membranas derivadas de RE a la mezcla de traducción estándar en lugar de membranas microsomales.

### **M4.C. SEDIMENTACIÓN DE MEMBRANAS.**

Tras la traducción *in vitro* y con el objetivo de enriquecer nuestra muestra con las proteínas que hayan sido correctamente direccionadas e insertadas en la bicapa lipídica, se sedimentaron las membranas depositando la mezcla de traducción sobre un colchón de 50  $\mu\text{l}$  de sacarosa 0.5M y se centrifugó a 45000 rpm (100000 g) durante 20 minutos a 4°C en una ultracentrífuga de mesa Beckman TL 100. El sedimento se resuspendió en 40  $\mu\text{l}$  de tampón de muestras para electroforesis SDS-PAGE, las muestras se calentaron a 70°C 10 minutos y rutinariamente se cargaron 15  $\mu\text{l}$  en minigeles de poliacrilamida que se corrió a un amperaje constante de 16 mA.



## **M5. ENTRECruzamiento DE INTERMEDIARIOS DE TRADUCCIóN.**

### **M5.A. ENTRECruzamiento QUíMICO.**

Los agentes entrecruzadores químicos utilizados en este trabajo fueron BMH (bismaleimidoheptano) y SMCC (succinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato), ambos de Pierce. BMH es un entrecruzador homobifuncional que posee dos grupos maleimida reactivos separados por un brazo espaciador de 13Å que pueden interaccionar, cada uno de ellos, con un grupo sulfhidrilo de alguna cisteína accesible; SMCC es heterobifuncional con un grupo maleimida reactivo separado por un espaciador de 8.3 Å de un grupo reactivo succinimida, por lo que este agente puede reaccionar por una parte con una cisteína (grupo sulfhidrilo) y con la otra con una amina primaria (lisina).

Para generar los intermediarios de traducción los mRNAs truncados se tradujeron durante 20 minutos a 30°C en presencia de membranas microsomales y <sup>35</sup>S-metionina. Tras la traducción se añadió cicloheximida (Sigma) 2.5 mM y se incubó 10 minutos en hielo. Se sedimentaron las membranas utilizando un colchón HSC (*High Salt Cushion*, 250 mM sacarosa, 500 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 50 mM Hepes.KOH pH 7.9 ). El precipitado se resuspendió en 20 µl de tampón KHM (110 mM KOAc, 2 mM mgOAc, 20 mM HepesS.KOH pH 7.2) y se añadió BMH o SMCC a concentración 0.5 mM, dejando incubar 10 minutos a 30°C. La reacción se para añadiendo 1/10 del volumen de reacción de β-mercaptoetanol 100mM en el caso de los agentes que sean sulfhidril reactivos (como el BMH); para parar la reacción del SMCC se añade 1/10 del volumen de reacción de 100 mM β-mercaptoetanol y 1/20 de glicina 1 M (ya que este agente es heterobifuncional, conteniendo un grupo sulfhidril reactivo y otro

amino reactivo). Incubar a 30°C durante 5 minutos. Finalmente, se liberaron las cadenas nacientes del ribosoma adicionando RNasa A a una concentración de 250 µg/ml, incubar 5 minutos a 37°C.

#### **M5.B. FOTOENTRECRUZAMIENTO.**

Para los experimentos de fotoentrecruzamiento de cadenas nacientes de TRAM con la SRP se realizaron traducciones *in vitro* de un mRNA truncado que codifica para los primeros 89 aminoácidos de la proteína en un volumen de 50 µl utilizando extractos de germen de trigo en presencia de 20 mM Hepes pH 7.4, 4 mM de acetato magnésico, 100 mM de acetato potásico, 40 nM de SRP purificada, 32 pmoles de ε-ANB-Lys-tRNA<sup>amb</sup> (Prof. A. E. Johnson, TAMU, USA) y <sup>35</sup>S-Met, 26°C durante 40 minutos. Después de la traducción, las muestras se incubaron 12 minutos en hielo, previamente al tratamiento con luz UV que se realizó durante 15 minutos utilizando una lámpara de mercurio de 500 W. A continuación las muestras fueron sometidas a una digestión con RNasa A (26°C, 30 min) para desestabilizar los complejos tRNA-cadena naciente que podrían enmascarar los aductos formados. Los fotoaductos se depositaron sobre 120 µl de un colchón de sacarosa (0.5 M sacarosa, 20 mM Hepes pH 7.4, 4 mM acetato magnésico, 100 mM acetato potásico) y se centrifugaron en un rotor TLA100 (Beckman) a 100000 g durante 4 minutos a 4°C. Los sedimentos se resuspendieron en tampón de carga, se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior autorradiografía.

Para los ensayos de fotoentrecruzamiento con Sec61α y la propia TRAM endógena, mRNAs truncados que codifican para los primeros 109 residuos de TRAM fueron traducidos en la misma mezcla de reacción vista pero en presencia de membranas microsomales. Los productos de traducción fueron sometidos a fotólisis previamente a la sedimentación de las

membranas, como se ha descrito previamente, y la identificación de los aductos por inmunoprecipitación con los anticuerpos correspondientes.

### **Inmunoprecipitación (IP) en condiciones desnaturalizantes.m**

Las membranas sedimentadas se resuspendieron en 50  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM a pH 7.5, 3% (p/v) SDS y se incubaron a 55°C durante 30 minutos. Las muestras se diluyeron con 500  $\mu$ l de tampón A (140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 2% (v/v) Tritón X-100) para la IP frente a Sec61 $\alpha$  y con tampón B (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% (v/v) Tritón X-100) para la IP frente a TRAM. Las muestras se clarificaron incubándolas en agitación con 30  $\mu$ l de proteína A-sefarosa (Sigma) preparada en tampón A/B (dependiendo del anticuerpo utilizado) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de eliminar la resina de sefarosa por centrifugación, el sobrenadante se incubó durante toda la noche a 4°C con antisuero de conejo purificado por cromatografía de afinidad, específico para Sec61 $\alpha$  o TRAM (Research Genetics, Huntsville, AL). Por la mañana, se añadió 30  $\mu$ l de esferas de proteína A-sefarosa y se incubaron las muestras 2 horas a 4°C. Se sedimentaron las esferas de nuevo y se lavaron dos veces con 750  $\mu$ l de tampón A/B, seguidamente se realizó un último lavado con el mismo tampón pero sin detergente. A las muestras se les añadió tampón de muestras y se analizaron por SDS-PAGE.

## **M.6. PREPARACIÓN DE CÉLULAS SEMIPERMEABILIZADAS.**

Para poder determinar si la disminución en la cantidad de moléculas de TRAM en cultivos de células HeLa generada por el tratamiento con siRNA influía en la capacidad de inserción en membranas de ciertas proteínas

tuvimos que semipermeabilizar estas células (células SP) con el detergente digitonina para posteriormente utilizarlas como fuente de membranas de RE en experimentos de traducción *in vitro*. La cantidad de digitonina requerida para la solubilización de la membrana plasmática y la cantidad de células SP que debe añadirse a la mezcla de traducción *in vitro* debe optimizarse para cada línea celular, el siguiente protocolo está diseñado para las líneas celulares humanas HT1080 (fibroblastos) y HeLa (Wilson et al., 1995).

Las células crecidas durante 48 horas tras el tratamiento con el siRNA anti-TRAM (en placas de 10 cm de diámetro) se lavaron dos veces con 10 mL de PBS para eliminar el medio nutritivo que pudiera inhibir a la tripsina. Se añadió 2 mL de tripsina atemperada por placa y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para despegar las células de la placa. Se añadieron 4 mL de tampón KHM (110 mM KOAc, 2 mM MgOAc, 20 mM HEPES.KOH pH 7.2 y 8  $\mu$ L de una solución 50 mg/mL de inhibidor de tripsina Soybean (Sigma) preparada en agua estéril (concentración final 100  $\mu$ g/mL). Las células fueron transferidas a un tubo de 15 mL y se dejaron reposar en hielo. Se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 3 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante por aspiración. Inmediatamente el pellet se resuspendió en 4 mL de KHM frío y se añadieron 8  $\mu$ L de digitonina (Calbiochem) a partir de una solución de 40 mg/mL en DMSO (concentración final 40  $\mu$ g/mL) dejando actuar el detergente durante 8 minutos en hielo. La digitonina se asocia preferentemente al colesterol, por este motivo permeabiliza la membrana plasmática dejando casi intacta la del retículo endoplásmico. Tras la fase de permeabilización se ajustó el volumen a 14 mL con tampón KHM frío y las células se recogieron por centrifugación a 1200 rpm durante 3 min, se eliminó el sobrenadante por aspiración y el pellet se resuspendió en 5 mL de tampón HEPES (90 mM HEPES.KOH pH 7.2, 50 mM KOAc) frío (este tratamiento permite eliminar los componentes del citosol). Esta mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó la muestra a 1200 rpm, 3 minutos a 4°C. Se aspiró el

sobrenadante y las células fueron resuspendidas cuidadosamente en 1 ml de tampón KHM frío. Para cuantificar la concentración de células SP obtenidas se separó una alícuota de 5  $\mu$ l a la que se le añadió Azul Tripano. Las células se contaron en una cámara de cuenta Neubauer, aquellas que han sido permeabilizadas se verán teñidas de azul. Para obtener una buena preparación de células SP debemos tener una concentración del orden de  $1 \times 10^6$  células azules/ml. El extracto de células SP se transfirió a un tubo y se centrifugó a 10000 rpm 45 segundos, se eliminó el sobrenadante por aspiración y el precipitado se resuspendió en 100  $\mu$ l de tampón KHM. Se añadió 1  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M y 1  $\mu$ l de nucleasa de micrococo dejando incubar 12 minutos a temperatura ambiente para eliminar el mRNA endógeno. Posteriormente, se eliminó el calcio para inactivar la nucleasa utilizando como quelante 1  $\mu$ l de EGTA 0.4 M. Tras este tratamiento se aislaron las células centrifugando a 10000 rpm 45 segundos y las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de tampón KHM (este volumen es orientativo, se debe resuspender en un volumen tal que en 2  $\mu$ l haya del orden de  $1 \times 10^5$  células para que las traducciones *in vitro* sean eficientes). Añadir 2  $\mu$ l de células SP como fuente de membranas a la mezcla de traducción *in vitro*.

## **M7. ENSAYOS ENZIMÁTICOS.**

### **M7.A. ENDOGLICOSIDASA H.**

Con el objetivo de eliminar los residuos de azúcar añadidos por la oligosacaryltransferasa (OST), al resultado de la traducción *in vitro* en presencia de membranas microsomales se le añadió 6 volúmenes de citrato tri-sódico 70 mM pH 5.5 (tampón citrato). La mezcla se depositó sobre 50  $\mu$ l de tampón citrato 0.2 M sacarosa y se sometió a ultracentrifugación (20 minutos a 45000 rpm, Beckman TL100 rotor TLA-55). El precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ l de tampón citrato conteniendo 1% SDS, 5%  $\beta$ -

mercaptoetanol y se incubó 10 minutos a 95°C. Posteriormente se añadió 0.1 mU/ $\mu$ l de endoglicosidasa H y se incubó la muestra 1 hora a 37°C. Tras la incubación las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior autorradiografía.

### **M7.B. DIGESTIÓN CON PROTEINASA K.**

Las endopeptidasas son enzimas proteolíticas ampliamente utilizadas en la determinación de la topología de proteínas de membrana (referencia). Generalmente se emplea proteinasa K (PK) o tripsina aunque existen numerosas enzimas que pueden ser utilizadas, como pepsina, papaína o quimiotripsina. Muchas de estas proteínas mantienen su actividad en presencia de distintas sustancias desnaturizantes como SDS, urea o agentes quelantes (EDTA); además, trabajan en un amplio rango de pH. Esta versatilidad las convierte en una potente herramienta de trabajo. El fundamento es similar para todas ellas. Estas proteasas son capaces de hidrolizar otras proteínas pero ninguna de ellas es capaz de atravesar la bicapa lipídica, de manera que, únicamente aquellos dominios de las proteínas de membrana accesibles a las proteasas serán digeridos. Analizando mediante electroforesis el número y tamaño de los péptidos que se generan tras la digestión, es decir, aquellos que son inaccesibles para las proteasas (siempre y cuando estos fragmentos producidos sean de un tamaño suficientemente grande) podremos deducir la topología de la proteína.

Tras la traducción *in vitro* en presencia o ausencia de membranas (según el requerimiento) a las muestras seleccionadas se les añadió 1  $\mu$ l de PK a una concentración de 2 mg/mL y se las incubó 20 minutos en hielo. Para detener la digestión se añadió 1  $\mu$ L de PMSF a una concentración de 0.2 M. La centrifugación de membranas se realizó según el protocolo descrito

anteriormente con la excepción de que se empleó un tampón HEPES 140 mM, acetato magnésico 4 mM y acetato potásico 100 mM suplementado con PMSF 1 mM. El sedimento, conteniendo las membranas y las proteínas asociadas a éstas, se analizó mediante electroforesis en gel de acrilamida.

## **M8. ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LAS SECUENCIAS PROTEICAS.**

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

TMHMM <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

HMMTOP <http://www.enzim.hu/hmmtop/>

TOPPRED <http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/>

$\Delta G$  prediction server (Hessa et al., 2007) <http://www.cbr.su.se/DGpred/>

## **M9. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN.**

Antes de la electroforesis las muestras fueron suplementadas con tampón de carga (Tris-HCl 625 mM pH 6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 4% (v/v), azul de bromofenol 0.025% (p/v)) y sometidas a desnaturalización durante 5 minutos a 95°C. Las electroforesis se realizaron generalmente a un amperaje constante de 16 mA y un voltaje máximo de 110 V, empleando minigeles con porcentajes de poliacrilamida del 10%, 12%, 16% y 20% según los casos. Tras la electroforesis, las proteínas

marcadas radiactivamente con  $^{35}\text{S}$  se fijaron con una solución de acético 5% y metanol 20% durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación los geles se secaron empleando un secador de geles Slab Gel Dryer modelo SGD 5040 de Savant (EE.UU) y se espusieron durante al menos 12 horas en una pantalla BAS-MP 2025 (Fujifilm). Finalmente las pantallas se analizaron en un *Fujifilm Fluorescent Image Analyzer* modelo FLA-300R (Tokyo, Japón) usando el programa *Image Gauge 3.12 Science Lab 98* de Fuji Photo Film para su visualización y cuantificación

### **Inmunodetección.**

Tras la electroforesis de las muestras en geles de poliacrilamida las proteínas fueron transferidas (300 mA durante 2 horas, transferencia mojada) a una membrana de nitrocelulosa *Hybond-ECL* (Amersham Bioscience). Para la inmunodetección se empleó el sistema *ECL* de Amersham Bioscience (UK) siguiendo las instrucciones del proveedor. El anticuerpo primario anti-V5 se utilizó a una dilución 1:5000 y el secundario anti-ratón a 1:20000. El anticuerpo primario antiTRAM fue utilizado a una dilución 1:3000 y el secundario anti-conejo a 1:10000. La membrana de nitrocelulosa, una vez marcada con el reactivo *ECL*, se expuso frente a una película fotográfica Fujifilm durante un tiempo variable según las condiciones del experimento, para luego ser revelada.



# BIBLIOGRAFÍA

---

## Bibliografía

Abell, B.M., High, S., and Moloney, M.M. (2002). Membrane protein topology of oleosin is constrained by its long hydrophobic domain. *J Biol Chem* 277, 8602-8610.

Amit, M., Berisio, R., Baram, D., Harms, J., Bashan, A., and Yonath, A. (2005). A crevice adjoining the ribosome tunnel: hints for cotranslational folding. *FEBS Lett* 579, 3207-3213.

Andersson, H., and von Heijne, G. (1994). Positively charged residues influence the degree of SecA dependence in protein translocation across the E. coli inner membrane. *FEBS Lett* 347, 169-172.

Andrews, D.W., Walter, P., and Ottensmeyer, F.P. (1985). Structure of the signal recognition particle by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 785-789.

Bacher, G., Pool, M., and Dobberstein, B. (1999). The ribosome regulates the GTPase of the beta-subunit of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* 146, 723-730.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905-920.

Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R.E., Brunner, J., and Muller, M. (2001). YidC, an assembly site for polytopic Escherichia coli membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep* 2, 709-714.

Becker, T., Bhushan, S., Jarasch, A., Armache, J.P., Funes, S., Jossinet, F., Gumbart, J., Mielke, T., Berninghausen, O., Schulten, K., *et al.* (2009). Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science* 326, 1369-1373.

Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., and Frank, J. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science* 278, 2123-2126.

Beckmann, R., Spahn, C.M., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P.A., Sali, A., Frank, J., and Blobel, G. (2001). Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* 107, 361-372.

Beilharz, T., Egan, B., Silver, P.A., Hofmann, K., and Lithgow, T. (2003). Bipartite signals mediate subcellular targeting of tail-anchored membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 8219-8223.

Berndt, U., Oellerer, S., Zhang, Y., Johnson, A.E., and Rospert, S. (2009). A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1398-1403.

Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1496-1500.

Blobel, G., and Sabatini, D.D. (1970). Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. I. Location of the polypeptides within ribosomes. *J Cell Biol* 45, 130-145.

Brundage, L., Hendrick, J.P., Schiebel, E., Driessen, A.J., and Wickner, W. (1990). The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* 62, 649-657.

Cross, B.C., and High, S. (2009). Dissecting the physiological role of selective transmembrane-segment retention at the ER translocon. *J Cell Sci* 122, 1768-1777.

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.

Daniel, C.J., Conti, B., Johnson, A.E., and Skach, W.R. (2008). Control of translocation through the Sec61 translocon by nascent polypeptide structure within the ribosome. *J Biol Chem* 283, 20864-20873.

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

de Planque, M.R., Bonev, B.B., Demmers, J.A., Greathouse, D.V., Koeppe, R.E., 2nd, Separovic, F., Watts, A., and Killian, J.A. (2003). Interfacial anchor properties of tryptophan residues in transmembrane peptides can dominate over hydrophobic matching effects in peptide-lipid interactions. *Biochemistry* 42, 5341-5348.

DeGrado, W.F., Gratkowski, H., and Lear, J.D. (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.

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

Deshai, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A., and 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.

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

Donohue, P.J., Sainz, E., Akesson, M., Kroog, G.S., Mantey, S.A., Battey, J.F., Jensen, R.T., and Northup, J.K. (1999). An aspartate residue at the extracellular boundary of TMII and an arginine residue in TMVII of the gastrin-releasing peptide receptor interact to facilitate heterotrimeric G protein coupling. *Biochemistry* 38, 9366-9372.

Driessen, A.J. (1994). How proteins cross the bacterial cytoplasmic membrane. *J Membr Biol* 142, 145-159.

Enquist, K., Fransson, M., Boekel, C., Bengtsson, I., Geiger, K., Lang, L., Pettersson, A., Johansson, S., von Heijne, G., and Nilsson, I. (2009). Membrane-integration characteristics of two ABC transporters, CFTR and P-glycoprotein. *J Mol Biol* 387, 1153-1164.

- Facey, S.J., Neugebauer, S.A., Krauss, S., and Kuhn, A. (2007). The mechanosensitive channel protein MscL is targeted by the SRP to the novel YidC membrane insertion pathway of Escherichia coli. *J Mol Biol* *365*, 995-1004.
- Fons, R.D., Bogert, B.A., and Hegde, R.S. (2003). Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J Cell Biol* *160*, 529-539.
- Gafvelin, G., Sakaguchi, M., Andersson, H., and von Heijne, G. (1997). Topological rules for membrane protein assembly in eukaryotic cells. *J Biol Chem* *272*, 6119-6127.
- Goder, V., Junne, T., and Spiess, M. (2004). Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule. *Mol Biol Cell* *15*, 1470-1478.
- Goder, V., and Spiess, M. (2001). Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett* *504*, 87-93.
- Gorlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., and Rapoport, T.A. (1992). A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* *357*, 47-52.
- Gorlich, D., and Rapoport, T.A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* *75*, 615-630.
- Granseth, E., von Heijne, G., and Elofsson, A. (2005). A study of the membrane-water interface region of membrane proteins. *J Mol Biol* *346*, 377-385.
- 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.
- Halic, M., and Beckmann, R. (2005). The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol* *15*, 116-125.

- Hall, J.A., Fann, M.C., and Maloney, P.C. (1999). Altered substrate selectivity in a mutant of an intrahelical salt bridge in UhpT, the sugar phosphate carrier of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274, 6148-6153.
- Hamman, B.D., Chen, J.C., Johnson, E.E., and Johnson, A.E. (1997). The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* 89, 535-544.
- Hamman, B.D., Hendershot, L.M., and Johnson, A.E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, 747-758.
- Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A., and Akey, C.W. (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* 87, 721-732.
- Hardesty, B., and Kramer, G. (2001). Folding of a nascent peptide on the ribosome. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66, 41-66.
- Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* 107, 679-688.
- Hartmann, E., Gorlich, D., Kostka, S., Otto, A., Kraft, R., Knäspel, S., Burger, E., Rapoport, T.A., and Prehn, S. (1993). A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Eur J Biochem* 214, 375-381.
- Hartmann, E., Rapoport, T.A., and Lodish, H.F. (1989). Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5786-5790.
- Hedin, L.E., Ojemalm, K., Bernsel, A., Hennerdal, A., Illergård, K., Enquist, K., Kauko, A., Cristobal, S., von Heijne, G., Lerch-Bader, M., *et al.* (2010). Membrane insertion of marginally hydrophobic transmembrane helices depends on sequence context. *J Mol Biol* 396, 221-229.
- Hegde, R.S., Voigt, S., Rapoport, T.A., and Lingappa, V.R. (1998). TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* 92, 621-631.

Heinrich, S.U., Mothes, W., Brunner, J., and Rapoport, T.A. (2000). The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell* *102*, 233-244.

Heinrich, S.U., and Rapoport, T.A. (2003). Cooperation of transmembrane segments during the integration of a double-spanning protein into the ER membrane. *EMBO J* *22*, 3654-3663.

Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1997). Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett* *418*, 367-370.

Hell, K., Neupert, W., and Stuart, R.A. (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J* *20*, 1281-1288.

Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S.H., and von Heijne, G. (2005a). 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 Sec61 translocon. *Nature* *450*, 1026-1030.

Hessa, T., White, S.H., and von Heijne, G. (2005b). Membrane insertion of a potassium-channel voltage sensor. *Science* *307*, 1427.

High, S., Martoglio, B., Gorlich, D., Andersen, S.S., Ashford, A.J., Giner, A., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A., Dobberstein, B., *et al.* (1993). Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence. *J Biol Chem* *268*, 26745-26751.

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

Holt, A., and Killian, J.A. (2010). Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models. *Eur Biophys J* 39, 609-621.

Houben, E.N., Zarivach, R., Oudega, B., and Luirink, J. (2005). Early encounters of a nascent membrane protein: specificity and timing of contacts inside and outside the ribosome. *J Cell Biol* 170, 27-35.

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

Ismail, N., Crawshaw, S.G., Cross, B.C., Haagsma, A.C., and High, S. (2008). Specific transmembrane segments are selectively delayed at the ER translocon during opsin biogenesis. *Biochem J* 411, 495-506.

Janda, C.Y., Li, J., Oubridge, C., Hernandez, H., Robinson, C.V., and Nagai, K. (2010). Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. *Nature* 465, 507-510.

Johnson, A.E. (2004). Functional ramifications of FRET-detected nascent chain folding far inside the membrane-bound ribosome. *Biochem Soc Trans* 32, 668-672.

Johnson, A.E. (2009). The structural and functional coupling of two molecular machines, the ribosome and the translocon. *J Cell Biol* 185, 765-767.

Johnson, A.E., and van Waes, M.A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 799-842.

Junne, T., Kocik, L., and Spiess, M. (2010). The hydrophobic core of the Sec61 translocon defines the hydrophobicity threshold for membrane integration. *Mol Biol Cell* 21, 1662-1670.

Kalbfleisch, T., Cambon, A., and Wattenberg, B.W. (2007). A bioinformatics approach to identifying tail-anchored proteins in the human genome. *Traffic* 8, 1687-1694.



- Kanner, E.M., Klein, I.K., Friedlander, M., and Simon, S.M. (2002). The amino terminus of opsin translocates "posttranslationally" as efficiently as cotranslationally. *Biochemistry* *41*, 7707-7715.
- Kauko, A., Hedin, L.E., Thebaud, E., Cristobal, S., Elofsson, A., and von Heijne, G. (2010). Repositioning of transmembrane alpha-helices during membrane protein folding. *J Mol Biol* *397*, 190-201.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Stroud, R.M., and Walter, P. (2001). The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* *70*, 755-775.
- Kiefer, D., and Kuhn, A. (2007). YidC as an essential and multifunctional component in membrane protein assembly. *Int Rev Cytol* *259*, 113-138.
- Killian, J.A. (1998). Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta* *1376*, 401-415.
- Killian, J.A. (2003). Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. *FEBS Lett* *555*, 134-138.
- Koch, H.G., Moser, M., and Muller, M. (2003). Signal recognition particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* *146*, 55-94.
- Kosolapov, A., Tu, L., Wang, J., and Deutsch, C. (2004). Structure acquisition of the T1 domain of Kv1.3 during biogenesis. *Neuron* *44*, 295-307.
- Kowarik, M., Kung, S., Martoglio, B., and Helenius, A. (2002). Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* *10*, 769-778.
- Krieg, U.C., Walter, P., and Johnson, A.E. (1986). Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 8604-8608.
- Kuhlman, B., Yang, H.Y., Boice, J.A., Fairman, R., and Raleigh, D.P. (1997). An exceptionally stable helix from the ribosomal protein L9: implications for protein folding and stability. *J Mol Biol* *270*, 640-647.

Lasso, G., Antoniw, J.F., and Mullins, J.G. (2006). A combinatorial pattern discovery approach for the prediction of membrane dipping (re-entrant) loops. *Bioinformatics* *22*, e290-297.

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

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

Li, S.C., and Deber, C.M. (1994). A measure of helical propensity for amino acids in membrane environments. *Nat Struct Biol* *1*, 558.

Liao, S., Lin, J., Do, H., and Johnson, A.E. (1997). Both luminal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell* *90*, 31-41.

Lu, J., and Deutsch, C. (2005a). Folding zones inside the ribosomal exit tunnel. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 1123-1129.

Lu, J., and Deutsch, C. (2005b). Secondary structure formation of a transmembrane segment in Kv channels. *Biochemistry* *44*, 8230-8243.

Malkin, L.I., and Rich, A. (1967). Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding. *J Mol Biol* *26*, 329-346.

Mant, A., Schmidt, I., Herrmann, R.G., Robinson, C., and Klosgen, R.B. (1995). Sec-dependent thylakoid protein translocation. Delta pH requirement is dictated by passenger protein and ATP concentration. *J Biol Chem* *270*, 23275-23281.

Martoglio, B., Hofmann, M.W., Brunner, J., and Dobberstein, B. (1995). The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* *81*, 207-214.

Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97, 553-564.

McCormick, P.J., Miao, Y., Shao, Y., Lin, J., and Johnson, A.E. (2003). Cotranslational protein integration into the ER membrane is mediated by the binding of nascent chains to translocon proteins. *Mol Cell* 12, 329-341.

Meacock, S.L., Lecomte, F.J., Crawshaw, S.G., and High, S. (2002). Different transmembrane domains associate with distinct endoplasmic reticulum components during membrane integration of a polytopic protein. *Mol Biol Cell* 13, 4114-4129.

Meindl-Beinker, N.M., Lundin, C., Nilsson, I., White, S.H., and von Heijne, G. (2006). Asn- and Asp-mediated interactions between transmembrane helices during translocon-mediated membrane protein assembly. *EMBO Rep* 7, 1111-1116.

Menetret, J.F., Neuhof, A., Morgan, D.G., Plath, K., Radermacher, M., Rapoport, T.A., and Akey, C.W. (2000). The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation. *Mol Cell* 6, 1219-1232.

Meyer, T.H., Menetret, J.F., Breitling, R., Miller, K.R., Akey, C.W., and Rapoport, T.A. (1999). The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J Mol Biol* 285, 1789-1800.

Milligan, R.A., and Unwin, P.N. (1986). Location of exit channel for nascent protein in 80S ribosome. *Nature* 319, 693-695.

Mingarro, I., Nilsson, I., Whitley, P., and von Heijne, G. (2000). Different conformations of nascent polypeptides during translocation across the ER membrane. *BMC Cell Biol* 1, 3.

Mitra, K., and Frank, J. (2006). A model for co-translational translocation: ribosome-regulated nascent polypeptide translocation at the protein-conducting channel. *FEBS Lett* 580, 3353-3360.

Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C.L., 3rd, Ban, N., and Frank, J. (2005). Structure of the *E. coli* protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature* *438*, 318-324.

Monne, M., Nilsson, I., Johansson, M., Elmhed, N., and von Heijne, G. (1998). Positively and negatively charged residues have different effects on the position in the membrane of a model transmembrane helix. *J Mol Biol* *284*, 1177-1183.

Morgan, D.G., Menetret, J.F., Neuhof, A., Rapoport, T.A., and Akey, C.W. (2002). Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17A resolution. *J Mol Biol* *324*, 871-886.

Mothes, W., Prehn, S., and Rapoport, T.A. (1994). Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J* *13*, 3973-3982.

Muller, D.J., Wu, N., and Palczewski, K. (2008). Vertebrate membrane proteins: structure, function, and insights from biophysical approaches. *Pharmacol Rev* *60*, 43-78.

Nakatogawa, H., and Ito, K. (2002). The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate. *Cell* *108*, 629-636.

Nilsson, I., Kelleher, D.J., Miao, Y., Shao, Y., Kreibich, G., Gilmore, R., von Heijne, G., and Johnson, A.E. (2003). Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *J Cell Biol* *161*, 715-725.

Nilsson, I., and von Heijne, G. (2000). Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *J Biol Chem* *275*, 17338-17343.

Nilsson, I.M., and von Heijne, G. (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* *268*, 5798-5801.

- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* *289*, 920-930.
- Oresic, K., Ng, C.L., and Tortorella, D. (2009). TRAM1 participates in human cytomegalovirus US2- and US11-mediated dislocation of an endoplasmic reticulum membrane glycoprotein. *J Biol Chem* *284*, 5905-5914.
- Orzaez, M., Salgado, J., Gimenez-Giner, A., Perez-Paya, E., and Mingarro, I. (2004). Influence of proline residues in transmembrane helix packing. *J Mol Biol* *335*, 631-640.
- Osborne, A.R., and Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation is mediated by oligomers of the SecY complex with one SecY copy forming the channel. *Cell* *129*, 97-110.
- Osborne, A.R., Rapoport, T.A., and van den Berg, B. (2005). Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* *21*, 529-550.
- Ota, K., Sakaguchi, M., Hamasaki, N., and Mihara, K. (1998a). Assessment of topogenic functions of anticipated transmembrane segments of human band 3. *J Biol Chem* *273*, 28286-28291.
- Ota, K., Sakaguchi, M., Hamasaki, N., and Mihara, K. (2000). Membrane integration of the second transmembrane segment of band 3 requires a closely apposed preceding signal-anchor sequence. *J Biol Chem* *275*, 29743-29748.
- Ota, K., Sakaguchi, M., von Heijne, G., Hamasaki, N., and Mihara, K. (1998b). Forced transmembrane orientation of hydrophilic polypeptide segments in multispanning membrane proteins. *Mol Cell* *2*, 495-503.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C., and Dalbey, R.E. (2002). Signal peptidases. *Chem Rev* *102*, 4549-4580.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T.A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* *81*, 561-570.

Pitonzo, D., and Skach, W.R. (2006). Molecular mechanisms of aquaporin biogenesis by the endoplasmic reticulum Sec61 translocon. *Biochim Biophys Acta* 1758, 976-988.

Pitonzo, D., Yang, Z., Matsumura, Y., Johnson, A.E., and Skach, W.R. (2009). Sequence-specific retention and regulated integration of a nascent membrane protein by the endoplasmic reticulum Sec61 translocon. *Mol Biol Cell* 20, 685-698.

Pool, M.R. (2009). A trans-membrane segment inside the ribosome exit tunnel triggers RAMP4 recruitment to the Sec61p translocase. *J Cell Biol* 185, 889-902.

Pool, M.R., Stumm, J., Fulga, T.A., Sinning, I., and Dobberstein, B. (2002). Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science* 297, 1345-1348.

Popot, J.L., and Engelman, D.M. (1990). Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* 29, 4031-4037.

Popot, J.L., Gerchman, S.E., and Engelman, D.M. (1987). Refolding of bacteriorhodopsin in lipid bilayers. A thermodynamically controlled two-stage process. *J Mol Biol* 198, 655-676.

Rabu, C., and High, S. (2007). Membrane protein chaperones: a new twist in the tail? *Curr Biol* 17, R472-474.

Rabu, C., Schmid, V., Schwappach, B., and High, S. (2009). Biogenesis of tail-anchored proteins: the beginning for the end? *J Cell Sci* 122, 3605-3612.

Ramon-Maiques, S., Fernandez-Murga, M.L., Gil-Ortiz, F., Vagin, A., Fita, I., and Rubio, V. (2006). Structural bases of feed-back control of arginine biosynthesis, revealed by the structures of two hexameric N-acetylglutamate kinases, from *Thermotoga maritima* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* 356, 695-713.

Randall, L.L., Topping, T.B., Hardy, S.J., Pavlov, M.Y., Freistroffer, D.V., and Ehrenberg, M. (1997). Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 802-807.

- Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* *450*, 663-669.
- Rapoport, T.A., Goder, V., Heinrich, S.U., and Matlack, K.E. (2004). Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends Cell Biol* *14*, 568-575.
- Ridder, A., Skupjen, P., Unterreitmeier, S., and Langosch, D. (2005). Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. *J Mol Biol* *354*, 894-902.
- Robinson, C., and Bolhuis, A. (2004). Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* *1694*, 135-147.
- Romisch, K., Webb, J., Lingelbach, K., Gausepohl, H., and Dobberstein, B. (1990). The 54-kD protein of signal recognition particle contains a methionine-rich RNA binding domain. *J Cell Biol* *111*, 1793-1802.
- Sadlish, H., Pitonzo, D., Johnson, A.E., and Skach, W.R. (2005). Sequential triage of transmembrane segments by Sec61alpha during biogenesis of a native multispanning membrane protein. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 870-878.
- Sadlish, H., and Skach, W.R. (2004). Biogenesis of CFTR and other polytopic membrane proteins: new roles for the ribosome-translocon complex. *J Membr Biol* *202*, 115-126.
- Saksena, S., Shao, Y., Braunagel, S.C., Summers, M.D., and Johnson, A.E. (2004). Cotranslational integration and initial sorting at the endoplasmic reticulum translocon of proteins destined for the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 12537-12542.
- Sal-Man, N., Gerber, D., Bloch, I., and Shai, Y. (2007). Specificity in transmembrane helix-helix interactions mediated by aromatic residues. *J Biol Chem* *282*, 19753-19761.
- Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J., and Dalbey, R.E. (2000). YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* *406*, 637-641.

Sauri, A., McCormick, P.J., Johnson, A.E., and Mingarro, I. (2007). Sec61alpha and TRAM are sequentially adjacent to a nascent viral membrane protein during its ER integration. *J Mol Biol* 366, 366-374.

Sauri, A., Saksena, S., Salgado, J., Johnson, A.E., and Mingarro, I. (2005). Double-spanning plant viral movement protein integration into the endoplasmic reticulum membrane is signal recognition particle-dependent, translocon-mediated, and concerted. *J Biol Chem* 280, 25907-25912.

Sauri, A., Tamborero, S., Martinez-Gil, L., Johnson, A.E., and Mingarro, I. (2009). Viral membrane protein topology is dictated by multiple determinants in its sequence. *J Mol Biol* 387, 113-128.

Schroder, K., Martoglio, B., Hofmann, M., Holscher, C., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A., and Dobberstein, B. (1999). Control of glycosylation of MHC class II-associated invariant chain by translocon-associated RAMP4. *EMBO J* 18, 4804-4815.

Seppala, S., Slusky, J.S., Lloris-Garcera, P., Rapp, M., and von Heijne, G. (2010). Control of membrane protein topology by a single C-terminal residue. *Science* 328, 1698-1700.

Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R., and Kuhn, A. (2004). Escherichia coli YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J* 23, 294-301.

Shakin-Eshleman, S.H., Spitalnik, S.L., and Kasturi, L. (1996). The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J Biol Chem* 271, 6363-6366.

Silberstein, S., and Gilmore, R. (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J* 10, 849-858.

Skach, W.R. (2009). Cellular mechanisms of membrane protein folding. *Nat Struct Mol Biol* 16, 606-612.

Skach, W.R., and Lingappa, V.R. (1993). Amino-terminal assembly of human P-glycoprotein at the endoplasmic reticulum is directed by cooperative actions of two internal sequences. *J Biol Chem* 268, 23552-23561.



Stefansson, A., Armulik, A., Nilsson, I., von Heijne, G., and Johansson, S. (2004). Determination of N- and C-terminal borders of the transmembrane domain of integrin subunits. *J Biol Chem* 279, 21200-21205.

Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J* 22, 6448-6457.

Tamborero, S., Vilar, M., Martinez-Gil, L., Johnson, A.E., and Mingarro, I. (2011). Membrane insertion and topology of the TRanslocating chain-Associating Membrane protein (TRAM). *J Mol Biol*.

Tate, C.G. (2010). Biochemistry. Membrane protein gymnastics. *Science* 328, 1644-1645.

Tu, L., Wang, J., and Deutsch, C. (2007). Biogenesis of the T1-S1 linker of voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Biochemistry* 46, 8075-8084.

Tu, L.W., and Deutsch, C. (2010). A folding zone in the ribosomal exit tunnel for Kv1.3 helix formation. *J Mol Biol* 396, 1346-1360.

Urbanus, M.L., Froderberg, L., Drew, D., Bjork, P., de Gier, J.W., Brunner, J., Oudega, B., and Luirink, J. (2002). Targeting, insertion, and localization of *Escherichia coli* YidC. *J Biol Chem* 277, 12718-12723.

Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36-44.

van der Laan, M., Bechtluft, P., Kol, S., Nouwen, N., and Driessen, A.J. (2004). F1F0 ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *J Cell Biol* 165, 213-222.

van der Laan, M., Houben, E.N., Nouwen, N., Luirink, J., and Driessen, A.J. (2001). Reconstitution of Sec-dependent membrane protein insertion: nascent FtsQ interacts with YidC in a SecYEG-dependent manner. *EMBO Rep* 2, 519-523.

van der Laan, M., Urbanus, M.L., Ten Hagen-Jongman, C.M., Nouwen, N., Oudega, B., Harms, N., Driessen, A.J., and Luirink, J. (2003). A conserved

function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5801-5806.

van Geest, M., and Lolkema, J.S. (2000). Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol Mol Biol Rev* *64*, 13-33.

van Klompenburg, W., Nilsson, I., von Heijne, G., and de Kruijff, B. (1997). Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *EMBO J* *16*, 4261-4266.

Viklund, H., Granseth, E., and Elofsson, A. (2006). Structural classification and prediction of reentrant regions in alpha-helical transmembrane proteins: application to complete genomes. *J Mol Biol* *361*, 591-603.

Vilar, M., Sauri, A., Monne, M., Marcos, J.F., von Heijne, G., Perez-Paya, E., and Mingarro, I. (2002). Insertion and topology of a plant viral movement protein in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* *277*, 23447-23452.

Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E., and Rapoport, T.A. (1996). Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* *134*, 25-35.

von Heijne, G. (1986a). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* *14*, 4683-4690.

von Heijne, G. (1986b). Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol* *189*, 239-242.

von Heijne, G. (1989). Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* *341*, 456-458.

von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* *225*, 487-494.

von Heijne, G. (2006). Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 909-918.

von Heijne, G. (2007). The membrane protein universe: what's out there and why bother? *J Intern Med* 261, 543-557.

Walter, P., and Blobel, G. (1981a). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* 91, 557-561.

Walter, P., and Blobel, G. (1981b). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* 91, 551-556.

Walter, P., Ibrahimi, I., and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* 91, 545-550.

Walter, P., and Johnson, A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10, 87-119.

Walter, P., and Lingappa, V.R. (1986). Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 2, 499-516.

White, S.H., and von Heijne, G. (2004). The machinery of membrane protein assembly. *Curr Opin Struct Biol* 14, 397-404.

Whitley, P., Nilsson, I.M., and von Heijne, G. (1996). A nascent secretory protein may traverse the ribosome/endoplasmic reticulum translocase complex as an extended chain. *J Biol Chem* 271, 6241-6244.

Wickner, W., and Schekman, R. (2005). Protein translocation across biological membranes. *Science* 310, 1452-1456.

Wilkinson, B.M., Critchley, A.J., and Stirling, C.J. (1996). Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *J Biol Chem* 271, 25590-25597.

Wilson, C.M., and High, S. (2010). Studying endoplasmic reticulum function in vitro using siRNA. *Methods Mol Biol* 619, 389-402.

Wilson, R., Allen, A.J., Oliver, J., Brookman, J.L., High, S., and Bulleid, N.J. (1995). The translocation, folding, assembly and redox-dependent degradation of secretory and membrane proteins in semi-permeabilized mammalian cells. *Biochem J* 307 ( Pt 3), 679-687.

Wimley, W.C., and White, S.H. (1996). Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol* 3, 842-848.

Woolhead, C.A., Johnson, A.E., and Bernstein, H.D. (2006). Translation arrest requires two-way communication between a nascent polypeptide and the ribosome. *Mol Cell* 22, 587-598.

Woolhead, C.A., McCormick, P.J., and 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, 725-736.

Woolhead, C.A., Thompson, S.J., Moore, M., Tissier, C., Mant, A., Rodger, A., Henry, R., and Robinson, C. (2001). Distinct Albino3-dependent and -independent pathways for thylakoid membrane protein insertion. *J Biol Chem* 276, 40841-40846.

Yau, W.M., Wimley, W.C., Gawrisch, K., and White, S.H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* 37, 14713-14718.

Yonath, A. (2005). Ribosomal crystallography: peptide bond formation, chaperone assistance and antibiotics activity. *Mol Cells* 20, 1-16.

Yonath, A., Leonard, K.R., and Wittmann, H.G. (1987). A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstruction. *Science* 236, 813-816.

Zhang, B., and Miller, T.F., 3rd (2010). Hydrophobically stabilized open state for the lateral gate of the Sec translocon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5399-5404.

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.

Zhou, F.X., Merianos, H.J., Brunger, A.T., and Engelman, D.M. (2001). Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2250-2255.

Zimmer, J., Nam, Y., and Rapoport, T.A. (2008). Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature* 455, 936-943.

Zopf, D., Bernstein, H.D., Johnson, A.E., and Walter, P. (1990). The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. *EMBO J* 9, 4511-4517.