



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**BÚSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE
LAS REGIONES MEMBRANOTRÓPICAS DE LA
GLICOPROTEÍNA S DEL SARS-CoV**

**SEARCH AND BIOPHYSICAL
CHARACTERIZATION OF THE
MEMBRANOTROPIC REGIONS OF
THE SARS-CoV GLYCOPROTEIN S.**

Jaime Guillén Casas
TESIS DOCTORAL 2008



D. José Manuel González Ros, Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

DA SU CONFORMIDAD a la lectura de la tesis doctoral titulada: “Búsqueda y caracterización biofísica de las regiones membranotrópicas de la glicoproteína S del SARS-CoV”, presentada por Don Jaime Guillén Casas.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 8 de Abril de 2008.

Fdo. Prof. José Manuel González Ros.



D. José Villalaín Boullón, Doctor en Ciencias y Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que conduce a la obtención del grado de doctor titulado: “Búsqueda y caracterización biofísica de las regiones membranotrópicas de la glicoproteína S del SARS-CoV”, del que es autor Don Jaime Guillén Casas, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 8 de Abril de 2008.

Fdo. Prof. José Villalaín Boullón

AGRADECIMIENTOS

Afortunadamente a lo largo de esta tesis no he estado solo en mi trabajo diario y he recibido ayuda, tanto directa como indirectamente, de mucha gente a la cual quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

A mi director de tesis, José Villalaín, por haber confiado en mi y haberme acogido en su laboratorio, guiándome con éxito durante todos estos años que han dado lugar a una tesis doctoral de la cual espero te encuentres orgulloso. Gracias por haberte preocupado para que mi etapa en tu laboratorio acabara en las condiciones más favorables para mi futuro que has podido lograr, mediante tu esfuerzo personal. Gracias por haber mostrado esa enorme confianza en mí, dejándome trabajar con independencia. Por intentar ser como un padre y darme consejos sobre mi futuro, después de todo, durante estos años he pasado más tiempo aquí que en mi propia casa. Gracias por dejar la puerta abierta de tu laboratorio si quiero regresar.

Al Profesor José Manuel González Ros, por haberme dado la oportunidad de formar parte de este IBMC del que ha sido fundador y en el cual me siento como en una gran familia.

A Jesús Sanz, por haberme introducido en este mundillo de la investigación en su laboratorio durante mi primer año en esta universidad, y a los miembros de su laboratorio, Nuria, Beatriz y María José, por haberme ayudado en esos primeros experimentos. En especial a Nuria, que fue la que nos tuvo que “soportar” a Miguel y a mí cuando esos geles no polimerizaban.

A José Antonio Poveda y Reyes Mateo por sus valiosos consejos y respuestas a mis preguntas sobre fluorescencia.

A esos super-secretarios, Javier, May y Carmen, por estar siempre dispuestos a atenderme cuando aparecía por allí para solucionar algún problema burocrático.

A toda mi familia de laboratorio, porque no puedo llamar solamente compañeros, a aquellos con los que he pasado tantos buenos y malos momentos. A Miguel, que puedo decir sobre tí, hemos estado juntos desde que llegamos a esta universidad, en clase, en laboratorios, en fiestas... Probablemente gran parte de mi tesis no hubiera sido posible sin tu apoyo, sin tus valiosas aportaciones en mi trabajo y sin tus consejos sobre experimentos. Espero que, aunque esta etapa haya terminado para ambos, no perdamos

nuestra amistad y esas ganas siempre de colaborar. A Anaj, mi mejor amiga en el IBMC, siempre recordaré todos los momentos que hemos pasado juntos durante estos años, tanto fuera como dentro del laboratorio. Otra parte de mi tesis ha sido posible gracias a ti. A Anai, por ser una excelente técnico de laboratorio y haber mantenido siempre a raya mi tendencia natural a llevar al caos las bancadas de laboratorio, gracias también por haberme ayudado en algunos de mis experimentos. A Ángela, Mónica, Marcela, Rober y Mariela, por haber estado siempre dispuestos a resolver mis dudas sobre técnicas y experimentos. En especial a Moni y Angelita por haberme tenido que sufrir como supervisoras en mis primeros experimentos. A Louis, ese francesito que me ayudó en su estancia en este laboratorio; merci beacoup, Louis. A Diego y Alejandro por haber sido participes en uno u otro momento de la alegría que siempre imperaba en el laboratorio.

A los demás familiares del IBMC, en especial a Mari, David y Víctor que, además de familia dentro, también lo habéis sido y seréis fuera de los laboratorios. A Maite por estar siempre dispuesta a ayudarme cuando la he necesitado. A mis maravillosas vecinas de lab donde siempre iba a pedir prestado material, Roci e Isa. A mis copilotos preferidas, Lourdes y a ti también Ali, aunque no pertenezcas al IBMC.

Al profesor Manuel Prieto y el Dr. Rodrigo Almeida, por haberme acogido en su laboratorio en Lisboa y enseñado tantas cosas sobre fluorescencia. Espero que nuestras fructíferas colaboraciones continúen durante mucho tiempo. Moito obrigado, Manuel e Rodrigo.

Al profesor Paavo Kinnunen por haberme acogido durante tres meses en su laboratorio en Helsinki y a todo su laboratorio por haberme hecho la estancia tan agradable. Thanks to Karen for her priceless help in the monolayers experiments, molte grazie, Karen!.

A mis compis favoritas de carrera, Chris y Estefi. Gracias Chris por ser tan buena compañera y amiga y haber compartido trabajos de clase y prácticas de laboratorio juntos. Gracias a ti también Estefanía por tu gran ayuda tanto en clase como en el IBMC.

Quiero dar las gracias también a todos mis compañeros en mi primera etapa en la Universidad de Alicante, por esos felices momentos que hacen que muchas veces sienta nostalgia de esa etapa de mi vida. Gracias Santi, Jose, Rubén, Cris, Mireia (¿eras de Biología, no?), Merce, Pilar, Raquel, Eli,...Espero que sigamos reuniéndonos de tanto en tanto.

Gracias también a todos mis amigos del mundo no académico ni profesional, porque, aunque no lo sepáis, habéis contribuido también a esta tesis. A Jose Antonio, mi amigo desde parvulitos como él siempre me recuerda, a Paquito, Antonio, Jorge, Jose, Borja, Óscar, Ana, Cris, Laura, Eva, Jessy, Lledó, Lucía, Rosa, Paco, Raúl, Isa, César, Esmeralda...

Me gustaría agradecer especialmente a mi familia, sin cuyo apoyo esta tesis no habría sido posible. A mis padres, Pedro y Mariana, gracias mamá por haberme inculcado en mi infancia las ansias por saber y aprender, seguramente gracias a ellos seguí por esta hermosa senda que es la ciencia. A mis hermanos, por estar siempre ahí cuando os he necesitado. También a mi nueva familia, gracias Olga por tratarme como a un hijo y por haberme permitido invadir tu comedor con mis artículos y papeles. También a mis cuñaditas, Susi y Lau y mi nueva sobrinita Carmen por contagiarme su alegría.

En último lugar quisiera agradecer a la persona a la que dedico esta tesis, Magalí. Gracias por haber entrado en mi vida y por haber estado a mi lado estos últimos años, compartiendo mis penas y mis alegrías, por haber accedido a formar una familia conmigo. Por ser comprensiva y permitir que dejara de dedicarte horas a ti para dárselas a la ciencia. Gracias por ser la persona más importante en mi vida y a la que pienso dedicar el resto de mis días, aunque yo también tenga que compartirme a tí con la ciencia. Espero que estés segura que no importa donde nos lleve la vida o la investigación, que lo único que importa es que estemos juntos. Gracias por haber seguido el camino, mi camino, aunque no estuviera marcado.

A Magalí



“La ignorancia afirma o niega rotundamente; la Ciencia duda.”

Francois Marie Arouet Voltaire

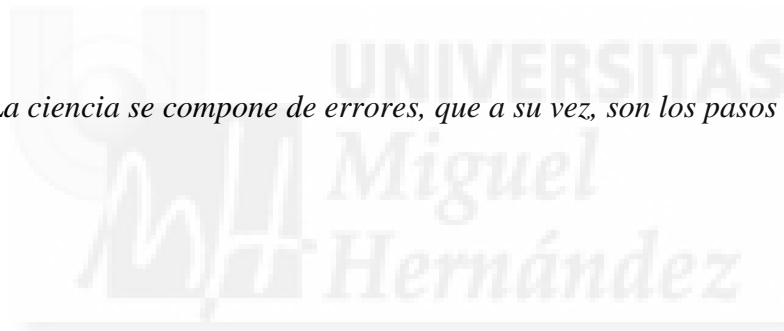
“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real.

Es un viaje, nunca una llegada.”

Kart R. Popper

“La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad.”

Julio Verne



ABREVIATURAS

ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
RNA	Ácido ribonucleico
CD	Dicroísmo Circular
Chol	Colesterol
CoV	Coronavirus
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin</i>
Di-8-ANEPPS	Di-8-ANEPPS 1-(3-sulfonatopropyl)-4-[b[2-(di- <i>n</i> -octylamino)-6-naphthyl]vinyl] pyridinium betaina
DMPA	1,2-Dimiristil- <i>sn</i> -glicero-3-ácido fosfatídico
DMPC	1,2-Dimiristil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DMPG	1,2-Dimiristil- <i>sn</i> -glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]
DMPS	1,2-Dimiristil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoserina
DO	Densidad óptica
DOPC	1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DPH	1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno
EPA	Ácido fosfatídico de yema de huevo
ESM	Esfingomielina de yema de huevo
FP	Péptido de fusión
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
H _I	Fase hexagonal-H _I
H _{II}	Fase hexagonal invertida-H _{II}
HCV	Virus de la hepatitis C
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HR1	Zona de heptadas repetidas 1
HR2	Zona de heptadas repetidas 2
IFP	Péptido de fusión interno
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
ILA	Asociación interlamelar

K_p	Coefficiente de partición
K_{SV}	Constante de Stern Volmer
L_α	Fase lamelar líquido-cristalina
L_β	Fase lamelar gel
$L_{\beta'}$	Fase lamelar gel inclinada
$L_{\beta I}$	Fase lamelar gel interdigitada
L_c	Fase cristalina
LSEctin	<i>Lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin</i>
L_o	Fase líquido-ordenada
LPC	Lisofosfatidilcolina
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MAS	<i>Magic angle spinning</i>
MHV	Virus de la hepatitis murina
MLV	Vesículas multilamelares
MVV	Vesículas multivesiculares
NBD-PE	N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-1,2-dihexadecanil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
N-Rh-PE	Lissamine TM rhodamina B 1,2-dihexadecanil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
ORF	<i>Open reading frame</i>
PA	Ácido fosfatídico
PA-DPH	Ácido propiónico 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
$P_{\beta'}$	Fase lamelar gel ondulada
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
POPC	1-Palmitil-2-oleil-sn-glycero-3-fosfocolina
PS	Fosfatidilserina
PTM	Región pretransmembrana
RBD	<i>Receptor binding domain</i>
RE	Reticulo endoplasmático

RMN	Resonancia magnética nuclear
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SM	Esfingomielina
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas
T_c	Temperatura de inicio de la transición de fase gel a líquido-cristalina
T_H	Temperatura de transición de fase lamelar a fase hexagonal- H_{II}
T_m	Temperatura de transición principal
TMA-DPH	1-(4-Trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno
TMC	Contacto trans-monocapa
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
5NS	Ácido 5-doxil-esteárico
16NS	Ácido 16-doxil-esteárico



Resumen/Abstract	9
1.- Resumen	11
2.- Abstract	13
Capítulo I. Introducción general	15
1.- Membranas Biológicas.	17
1.1.- Estructura y composición de las membranas biológicas.	18
1.2.- Composición lipídica y clases de lípidos	21
1.3.- Polimorfismo lipídico	26
1.4.- Estructura de la bicapa lipídica	30
1.5.- Procesos de fusión de membranas	31
2.- Proteínas de fusión víricas	35
3.- Síndrome respiratorio agudo severo (SARS).	38
3.1.- Taxonomía de coronaviridae	39
3.2.- Arquitectura del virión y organización genómica ...	40
3.2.1.- Proteínas estructurales.	42
3.2.2.- Proteínas no estructurales.	45
3.2.3.- Proteínas accesorias	45
3.3.- Origen del SARS-CoV.	46
3.4.- Receptor.	47
3.4.1.- Enzima convertora de angiotensina 2 (ACE 2).	47
3.4.2.- Lectinas como receptores potenciales.	48
3.5.- Entrada del virus a la célula	48
Capítulo II. Metodología general	53
1.- Formación de liposomas.	55
2.- Espectroscopia de infrarrojo	57

3.- Dicroísmo circular	62
4.- Ensayos de agregación de liposomas	64
5.- Fluorescencia	65
5.1.- Cálculo del coeficiente de partición de péptidos en membranas mediante espectroscopia de fluorescencia.	66
5.2.- Ensayos de atenuación de fluorescencia	67
5.3.- Ensayos de transferencia de energía (FRET)	69
5.3.1.- Ensayos de mezcla de lípidos (hemifusión y fusión).	69
5.4.- Anisotropía con sondas extrínsecas	70
5.5.- Estudios del potencial electrostático en la superficie de la membrana	71
5.6.- Fluorescencia resuelta en el tiempo	73
6.- Estudios en monocapas: inserción en monocapas e isotermas de compresión	74
6.1.- Inserción en monocapas	74
6.2.- Isotermas de compresión	75
7.- Resonancia magnética nuclear de ³¹P	76
Capítulo III. Objetivos y presentación de trabajos	79
Capítulo IV. Resultados y discusión	83
1.- Identificación de las regiones membrano-activas de la glicoproteína S del SARS-CoV	85
2.- Caracterización biofísica de las regiones membrano- activas de la glicoproteína S del SARS-CoV	90
2.1.- Interacción del péptido pretransmembrana de la glicoproteína S del SARS-CoV con membranas	91

2.2.- Interacción del péptido de fusión de la glicoproteína S del SARS-CoV con membranas	92
2.3.- Interacción del péptido interno de fusión de la glicoproteína S del SARS-CoV con membranas	92
3.- Discusión	93
Capítulo V. Conclusiones/Conclusions	99
1.- Conclusiones	101
2.- Conclusions	103
Capítulo VI. Bibliografía	107
Capítulo VII. Publicaciones	125
1.- Identification of the membrane-active regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike membrane glycoprotein using a 16/18-mer peptide scan: implications for the viral fusion mechanism	127
2.- Interaction of a peptide from the pre-transmembrane domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein with phospholipid membranes	139
3.- Structural and dynamic characterization of the interaction of the putative fusion peptide of the S2 SARS-CoV virus protein with lipid membranes	153
Anexo 1.	201
1.- The internal membrane-active peptide from SARS-CoV S2 glycoprotein. Biophysical characterization and membrane interaction	203

Resumen /Abstract



RESUMEN

La glicoproteína de envuelta *spike* del virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), una proteína de fusión viral de Clase I, es la responsable de la fusión entre las membranas del virus y la célula diana. Hemos identificado las regiones membrano-activas de la glicoproteína *spike* determinando el efecto de la integridad de membranas modelo de una librería de péptidos 16/18-mer derivadas de la glicoproteína *spike* del SARS-CoV, así como mediante un estudio teórico usando representaciones bidimensionales de momento hidrofóbico, hidrofobicidad e interfacialidad. En este estudio hemos investigado la interacción de varios dominios funcionales de la glicoproteína *spike* del SARS con diferentes tipos de membrana y más específicamente la interacción con membranas modelo de péptidos que representan el presunto péptido de fusión N-terminal (SARS_{FP}), el segundo presunto péptido de fusión (SARS_{IFP}) y el dominio pretransmembrana (SARS_{PTM}). El péptido SARS_{PTM} se une a diferentes tipos de membranas sin especificidad por ninguna composición lipídica en particular. Sin embargo, el efecto de agregación y fusión es dependiente de fosfolípidos cargados negativamente. El péptido SARS_{PTM} adopta diferentes conformaciones cuando se une a diferentes composiciones. En presencia de DMPG podemos observar un cambio de estructura en lámina β o péptidos auto agregados a una mezcla de estructura no ordenada y hélice α que tiene lugar a la misma temperatura de transición del lípido. Este cambio en presencia de fosfolípidos cargados negativamente podría estar relacionado con un posible papel del péptido en el proceso de fusión. El péptido SARS_{FP} se une fuertemente a membranas, causando agregación y fusión de una forma específica con fosfolípidos cargados negativamente, aumentando la penetración de agua y mostrando una actividad en la membrana modulada por la composición de lípidos de la membrana. El péptido muestra una tendencia a la formación de agregados β en tampón, pero en presencia de membranas la forma de organización es diferente dependiendo de la composición de la membrana. Estos datos sugieren que el péptido SARS_{FP} podría estar implicado en la fusión de la membrana viral y la de la célula huésped perturbando la hemicapa externa pero también interactuando con los fosfolípidos cargados negativamente de la hemicapa interna. El péptido SARS_{IFP} se une a e interacciona con membranas modelo de fosfolípidos y muestra una mayor afinidad por fosfolípidos cargados negativamente que por zwitteriónicos. El

péptido SARS_{IFP} disminuye la movilidad de los fosfolípidos y adopta diferentes conformaciones en la membrana dependiendo de su composición.

La identificación de estas regiones membrano-activas de la glicoproteína S del SARS-CoV apoya su papel directo en la fusión de membranas del SARS-CoV y apoya la idea de que la fusión mediada por proteínas es un proceso complejo, en el que varias regiones de la proteína de fusión interactúan, desestabilizan y fusionan las membranas. Además, la importancia de estos segmentos en el proceso de fusión podría definirlos como posibles dianas para el posterior desarrollo de nuevos compuestos antivirales.

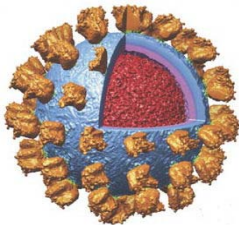


ABSTRACT

The severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) envelope spike (S) glycoprotein, a Class I viral fusion protein, is responsible for the fusion between the membranes of the virus and the target cell. We have identified the membrane-active regions of SARS-CoV spike glycoprotein by determining the effect of a 16/18-mer SARS-CoV spike glycoprotein peptide library on model membrane integrity as well as by a theoretical study using bidimensional plots of hydrophobic moment, hydrophobicity and interfaciality. In the present study, we have investigated the interaction of several predicted functional domains of the SARS spike glycoprotein with different types of membranes and more specifically the interaction with model membranes of peptides representing the N-terminal potential fusion peptide (SARS_{FP}), the second potential fusion peptide (SARS_{IFP}) and the pretransmembrane domain (SARS_{PTM}). The SARS_{PTM} peptide binds to different membrane types with no specificity for any particular lipid composition. However, the aggregation and fusion effect is dependent on negatively charged phospholipids. The SARS_{PTM} peptide adopts different conformations when bound to membranes of different compositions. In the presence of DMPG we can observe a change from β -sheet structures or self-aggregated peptides to a mixture of unordered and helical structures taking place at the same transition temperature of the lipid. This change in the presence of negatively-charged phospholipids might be related to a possible role of the peptide in the fusion process. The SARS_{FP} peptide strongly partitions in membranes, causing aggregation and fusion in a specific way with negatively-charged phospholipids, increasing also the water penetration depth and displaying membrane-activity modulated by the lipid composition of the membrane. The peptide shows a propensity for β -aggregate formation in buffer but in the presence of membranes, its organization is different depending upon the composition of the membrane. These data suggest that SARS_{FP} peptide could be involved in the merging of the viral and the target cell membranes by perturbing the membrane outer leaflet but also interacting with negatively-charged phospholipids located in the inner leaflet. The SARS_{IFP} peptide binds to and interacts with phospholipid model membranes and shows a higher affinity for negatively-charged phospholipids than for zwitterionic ones. The SARS_{IFP} peptide specifically decreases the mobility of the phospholipids and adopts different conformations in the membrane depending upon their composition.

The identification of these membrane-active regions of SARS-CoV S glycoprotein supports their direct role in the SARS-CoV membrane fusion and sustains the notion that protein-mediated fusion is a complex process, in which multiple regions from the viral fusion protein interact, destabilize and fuse membranes. Moreover, the importance of those segments in the fusion process may define them as possible targets for further development of new antiviral compounds.





Capítulo

I

Introducción general



1. Membranas biológicas

No podemos imaginar un organismo que no tenga una estructura y se encuentre indiferenciado del medio que le rodea. Por esta razón, en el camino que nos lleva desde las sustancias orgánicas hasta los seres vivos debieron crearse con total seguridad unas formas individuales, unos sistemas separados de su medio y con un orden interior. Así, la primera célula probablemente surgiría cuando se formó la primera membrana, encerrando las primeras reacciones químicas orgánicas y separando los primeros organismos primitivos del resto del universo. Ya en 1894 Alexander Oparin apuntaba al origen de la vida en formas aisladas de gotas coacerváticas o sistemas coloidales.

Mientras que en las células procarióticas existe un único compartimento generado por la membrana plasmática, en las células eucarióticas además de la membrana plasmática existe una gran variedad de membranas intracelulares que componen compartimentos cerrados u orgánulos, tales como la mitocondria, cloroplastos, peroxisomas y lisosomas, cada uno de los cuales presentan una especialización funcional. Las membranas biológicas establecen estructuras dinámicas en las que se desempeña una gran cantidad de procesos y reacciones. Actúan como barreras de permeabilidad selectiva, regulando la composición iónica y molecular del medio intracelular, permitiendo el mantenimiento de gradientes iónicos a ambos lados de la membrana (y por lo tanto el potencial de membrana). Además, gracias a proteínas transportadoras; sirven como soporte de numerosas proteínas generando un ambiente óptimo para el desarrollo de una multitud de procesos funcionales e intervienen en procesos de señalización celular entre otras funciones. El mantenimiento de la integridad de las membranas resulta vital puesto que pequeñas modificaciones podrían tener consecuencias fatales para la vida de la célula. Con su habilidad para romperse y volver a sellarse, dos membranas pueden fusionar, como sucede en la exocitosis, o un compartimento cerrado por una membrana puede, mediante fisión, dar lugar a dos nuevos compartimentos, como ocurre en la división celular, sin necesidad de crear grandes roturas en las superficies celulares. Procesos tan importantes como la regulación de la conversión de energía también tienen lugar en las membranas, donde la fotosíntesis, el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa no podrían realizarse sin la organizada batería de

enzimas que se disponen en ellas. Además de estos procesos, las membranas también juegan un papel central en las comunicaciones entre las células y su medio ambiente ya que son capaces de generar señales químicas ó eléctricas y/o presentar receptores específicos para señales externas controlando de este modo el flujo de información entre las células.

1.1. Estructura y dinámica de las membranas biológicas

Las membranas biológicas están compuestas por proteínas y lípidos unidos por interacciones no covalentes, y además, por carbohidratos, aunque éstos siempre están presentes en forma de glicolípidos o glicoproteínas. La composición, presencia, y proporción de cada uno de estos elementos varía según el tipo de membrana, manifestando la gran variedad de funciones y procesos en los que pueden encontrarse implicadas y, por lo tanto, los requerimientos del ambiente en el que se encuentran.

El primero en darse cuenta de que existía una capa semipermeable alrededor de las células de plantas fue Carl Nägeli en 1855, dándole el nombre de membrana plasmática. Entre 1895 y 1902, Ernest Overton midió la permeabilidad a través de la membrana celular de muchos compuestos y encontró una relación entre la capacidad de estos compuestos para atravesar a través de la membrana y su solubilidad en lípidos. Entonces propuso que son lípidos lo que forman esta fina capa de la membrana a través de las cuales las sustancias de las disoluciones que la rodean pasan a las células. Esta observación llevó a la famosa regla de Meyer-Overton que dice que la permeabilidad de las moléculas a través de la célula está gobernada por su solubilidad. En 1917, Irving Langmuir observó que se podía formar una monocapa de ácidos grasos en la interfase aire-agua, en un pocillo de Langmuir, con los grupos ácidos carboxilo hidrófilos dirigidos hacia el agua y los tallos metilos hidrofóbicos orientados hacia el aire. Este experimento comenzó la investigación con sistemas de monocapa Langmuir-Blodgett, que se han usado en muchos campos. En 1925, Evert Gorter y F. Grendel¹ hicieron su conocido experimento en el que extrajeron membranas de eritrocitos con acetona y dispersaron la muestra en agua en un pocillo de

¹ F. Grendel era el ayudante de Evert Gorter. Por alguna razón, su primer nombre no aparece documentado en publicaciones o registros de investigación.

Langmuir formándose una fina capa en la superficie del agua. Entonces fueron comprimiendo las moléculas de lípido en la interfase aire-agua para formar una monocapa lipídica. En la medida, el área de la monocapa lipídica resultó dos veces más extensa que el área de los eritrocitos calculada de los que los lípidos habían sido extraídos. Basándose en esta observación, Gorter y Grendel propusieron que los lípidos en la membrana de los eritrocitos se ordenaban en forma de bicapa lipídica. James Danielli y Hugo Davson elaboraron en 1935 un modelo en el cual postulaban que las superficies de la bicapa lipídica estaban cubiertas por proteínas. Pero, aunque este modelo explicaba la organización de los lípidos, no podía explicar las numerosas propiedades de las proteínas de membrana. Basándose en observaciones experimentales y una gran variedad de biomembranas modelo, en 1972 Jonathan Singer y Garth L. Nicolson propusieron su conocido modelo del mosaico fluido (Singer and Nicolson, 1972) (Figura 1), en el cual describen la membrana como una bicapa lipídica fluida en el que estarían embebidas las proteínas globulares que difundirían libremente.

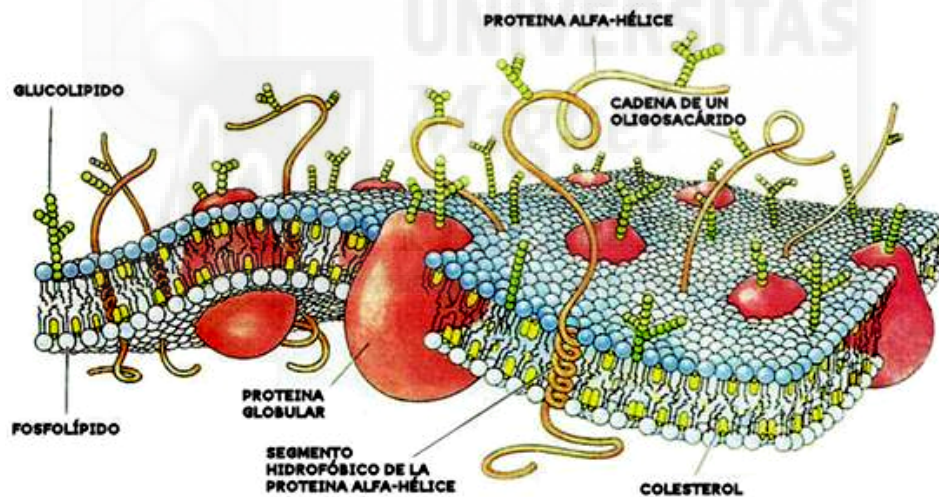


Figura 1. El modelo de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicholson en 1972.

Sin embargo, hoy en día sabemos que la estructura lateral de una membrana es mucho más compleja y refinada, y que los lípidos no tienen libertad total de difundir lateralmente ya que la distribución lateral de lípidos y proteínas es heterogénea y muy compleja (Ohvo-Rekila *et al.*, 2002). Además, por medio de imágenes de microscopía electrónica y microscopía de fuerza atómica (Damjanovich *et al.*, 1995) se han revelado la presencia de grupos de receptores de membrana. También, numerosas observaciones

experimentales (Hwang *et al.*, 1998) han proporcionado evidencias de la existencia de dominios lipídicos diferentes, denominadas balsas lipídicas (Simons and Vaz, 2004).

Combinando estas nuevas observaciones experimentales, Vereb *et al.* propusieron una versión modificada del modelo del mosaico fluido de Singer y Nicolson: modelo de mosaico fluido dinámicamente estructurado (Vereb *et al.*, 2003), en este modelo, patrones de co-distribución no aleatoria de clases específicas de proteínas formarían agrupaciones a pequeña escala en el nivel molecular y agrupaciones a gran escala en el nivel submicrométrico. Se sugiere que las fuerzas cohesivas que mantienen estas agrupaciones provienen de interacciones lípido-lípido, proteína-proteína y proteína-lípido, también como de efectores supramoleculares tales como el citoesqueleto y la matriz extracelular. Comparado con el modelo del mosaico fluido, el modelo del mosaico dinámicamente estructurado nos da una descripción más real de la estructura y propiedades funcionales de las biomembranas.

En general se han descrito cuatro tipos de movimientos que un lípido individual puede realizar (Figura 2). El primer tipo de movimiento es el conocido como “flip-flop” que describe el proceso de volteo de un lado de la bicapa al otro. Este proceso no es muy común y ocurre a escalas macroscópicas de tiempo (10^3 seg) (Blume, 1993) para un lípido individual. Sin embargo, este tipo de “flip-flop” puede ser estimulado por la presencia de enzimas unidas a membranas denominadas translocadores de fosfolípidos que catalizan el rápido flip-flop de fosfolípidos recién sintetizados de un lado de la monocapa del retículo endoplasmático al otro lado de la monocapa (Nelson and Cox, 2000). En contraste al flip-flop, los lípidos intercambian sus posiciones con sus vecinos en la misma monocapa a una gran velocidad ($\sim 10^7$ veces por segundo). El tercer movimiento está caracterizado por la rotación de los lípidos a lo largo de su eje longitudinal, con un tiempo de relajación de nano-segundos (Cevc and Sedden, 1993). Las cadenas hidrocarbурadas también sufren movimientos entrópicos que llevan a un desorden local. Éste es el cuarto tipo de movimiento en la bicapa lipídica. El frecuente movimiento térmico de los lípidos garantiza la fluidez de la bicapa lipídica que es esencial en procesos celulares tales como el transporte o actividad enzimática.

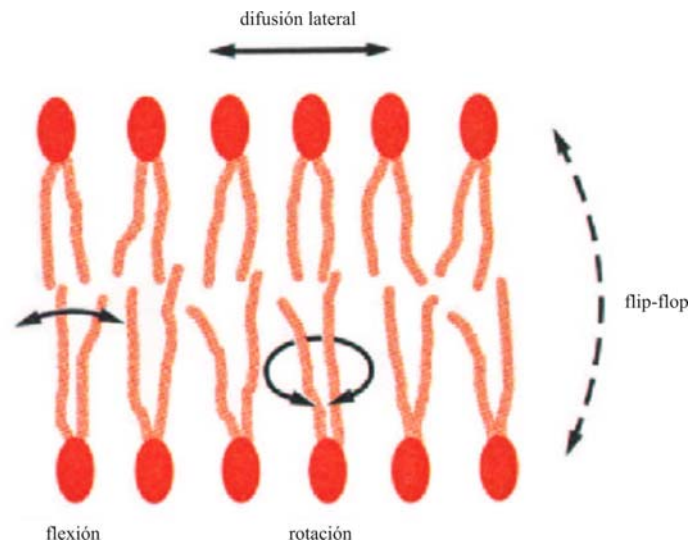


Figura 2. Diferentes tipos de movimiento de lípidos en un bicapa lipídica.

1.2. Composición lipídica y clasificación de lípidos

Las características estructurales de la bicapa lipídica están determinadas por sus lípidos constituyentes también como otros componentes moleculares. Los lípidos constituyen alrededor de un 50% de la masa de las membranas en una célula animal, mientras que el resto de la masa está formada principalmente por proteínas. El número de lípidos puede alcanzar hasta 10^9 en la membrana plasmática de una célula animal. La mayoría de los lípidos en las membranas celulares son anfífilos ya que tienen cabezas hidrofílicas cargadas o no cargadas y una o dos cadenas hidrocarbonadas.

Dentro de la célula, los diferentes compartimentos de las membranas presentan diferentes composiciones lipídicas, que vienen reguladas por el metabolismo lipídico local y el sistema de transporte lipídico (Crackower *et al.*, 2002). Los lípidos forman un grupo muy heterogéneo de sustancias que tienen en común su baja solubilidad en agua. Los principales tipos de lípidos que se pueden encontrar en las membranas biológicas son glicerofosfolípidos, glicoglicerolípidos, esfingofosfolípidos y esteroides.

-Glicerofosfolípidos, son los lípidos más abundantes de las membranas. En estos lípidos uno de los grupos hidroxilo de la molécula de glicerol se une a un grupo polar que contiene fosfato y los otros dos grupos hidroxilo se unen a sendos grupos carboxilos de dos cadenas

de ácidos grasos de cadena larga. Los fosfoglicéridos naturales, y en general todos los lípidos que se basan en un esqueleto de glicerol, se nombran sistemáticamente según la numeración estereoquímica *sn*. La mayoría de los fosfoglicéridos tienen el fosfato en la posición *sn*-3 del glicerol. Cuando los otros dos grupos hidroxilo del glicerol se unen a ácidos grasos mediante un enlace éster se denominan 1,2-diacilfosfoglicéridos (Figura 3). Los 1,2-diacilfosfoglicéridos forman un grupo de moléculas muy amplio (Rietveld *et al.*, 1993), que se diferencian según la longitud y la saturación de sus cadenas acílicas, y según el sustituyente unido al fosfato en posición *sn*-3 del glicerol. En la Figura 3 se muestran las estructuras de varios fosfolípidos con distintos grupos polares que se pueden unir al fosfato.

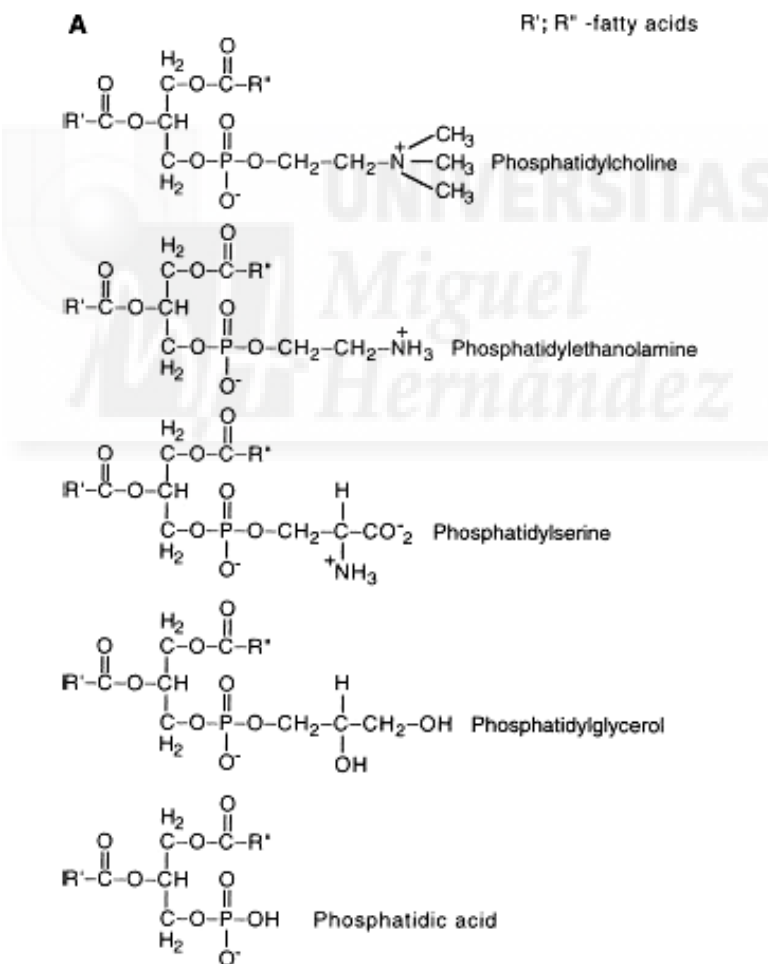


Figura 3. Ejemplo de algunas estructuras químicas de moléculas de fosfolípido.

La fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido más común en las membranas biológicas. La cabeza polar es zwitteriónica, y debido a la ausencia de donadores de enlaces de hidrógeno no es capaz de formar enlaces de hidrógeno entre sí. La fosfatidiletanolamina (PE), posee una cabeza polar zwitteriónica y al contrario que las PCs, éstas forman enlaces de hidrógeno entre ellas. Las moléculas de PE se pueden ensamblar de tres formas diferentes: fase lamelar gel, fase lamelar líquido-cristalina y fase hexagonal empaquetada en cilindros, los cuales se forman a temperaturas altas. La fosfatidilserina (PS) se encuentra en la mayoría de membranas de mamíferos, siendo el fosfolípido negativo más abundante. A pH neutro, la PS tiene una carga negativa de -1: una carga negativa en el grupo carboxilo, una segunda en el grupo fosfato y una carga positiva en el grupo amino. Las cabezas polares tienen tanto donadores como aceptores de enlaces de hidrógeno, pudiendo así formar enlaces de hidrógeno entre ellas, lo que hace que el fosfolípido tenga temperaturas de transición altas. El ácido fosfatídico (PA) tiene una carga de -1 a pH neutro. Como en el caso de la PS, la PA se estabiliza por la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, lo que hace incrementar su temperatura de transición en comparación con las PCs. El fosfatidilglicerol (PG), también tiene una carga negativa de -1 a pH neutro, debido a la ionización del grupo fosfato. Sin embargo, la PG no se estabiliza por la formación de enlaces de hidrógeno: su temperatura de transición es similar a la correspondiente con las PCs. Los fosfolípidos que contienen colina, la PC y la esfingomielina (SM) (ver más abajo), se encuentran preferentemente en la monocapa externa, mientras que los lípidos que contienen aminas, como la PE y la PS se encuentran preferentemente localizados en la monocapa interna. La PC y la PS proporcionan superficies de membrana hidratadas o cargadas, permitiendo al agua e iones unirse a sus cabezas polares. En contraste, las superficies ricas en PE son hidrofóbicas, poco hidratadas y promueven interacciones entre superficies de membrana diferentes sin la unión directa de proteínas. Puesto que la PE no se hidrata fácilmente, promueve la formación de estructuras de tipo no lamelar para compensar el efecto hidrofóbico, como se comentaba anteriormente. La inestabilidad inherente de este fosfolípido es necesaria en funciones celulares como la fusión de membranas.

-Glicoglicerolípidos, se diferencian de los glicerofosfolípidos en el sustituyente unido al hidroxilo del carbono *sn*-3 del esqueleto de glicerol. En los glicoglicerolípidos se forma un

enlace glicósido con un carbohidrato, en vez de unirse a un fosfato como ocurre en los fosfoglicéridos. Los glicoglicerolípidos predominan en la membrana de los cloroplastos y también abundan en bacterias.

-Esfingofosfolípidos, son otro tipo de lípidos, y su unidad estructural es la ceramida. La ceramida está compuesta generalmente por esfingosina (4-esfingenina, un aminodiol trans-monoin saturado de 18 átomos de carbono) unida mediante un enlace amida a un ácido graso. Los diferentes tipos de esfingolípidos se clasifican en función del grupo polar que se une al hidroxilo libre del carbono en posición 1 de la ceramida (Figura 4). Cuando el grupo polar es fosforilcolina, el esfingolípidos se denomina esfingomielina (SM), cuando se incorpora un azúcar simple son cerebrósidos, mientras que cuando es un oligosacárido más complejo, en el que además se incluye uno o más residuos de ácido siálico, se denominan gangliósidos (Figura 4). La SM es un componente fundamental de la membrana plasmática de las células eucariotas (Ramstedt and Slotte, 2002). En muchas células de mamíferos los contenidos de SM varían en un rango entre el 2 y el 15% de los fosfolípidos totales del organismo, dependiendo del tejido estudiado. La SM actúa como componente estructural de las membranas biológicas junto a otros fosfolípidos, glicolípidos, colesterol y algunas proteínas integrales de membrana. Adicionalmente a su función estructural la SM también participa en procesos de señalización celular. La región interfacial de la SM tiene regiones donadoras y receptoras de enlaces de hidrógeno, comparado con la región correspondiente de la PC, la cual sólo contiene grupos aceptores de enlaces de hidrógeno (Ohvo-Rekila *et al.*, 2002). Los esfingolípidos difieren de la mayoría de los fosfolípidos biológicos en que contienen cadenas acílicas largas y muy saturadas. Ésto les permite empaquetarse fácilmente juntos, una propiedad que da a los esfingolípidos temperaturas de fusión (T_m) mucho mayores que las del resto de (glico)fosfolípidos de la membrana, que son ricos en cadenas acílicas insaturadas (Brown and London, 2000). Las diferentes capacidades de empaquetamiento de esfingolípidos y fosfolípidos son uno de los factores que contribuyen a la formación de dominios en la membrana.

un impacto significativo en las funciones de membrana. La adición de colesterol en membranas aumenta la rigidez de la fase fluida y la adición de éste en membranas en fase gel aumenta la fluidez de la membrana, incluso puede conducir a la formación de fases líquido ordenadas (l_o). La importancia de la contribución del colesterol a las propiedades de la membrana se refleja en su distribución ubicua y su necesidad para el correcto crecimiento y función celular.

1.3. Polimorfismo lipídico

La importancia biológica del polimorfismo lipídico se pone de manifiesto en procesos tan diversos como la fusión de membranas, el tráfico de proteínas mediado por vesículas, el movimiento transversal de moléculas a través de la membrana, o la estabilización de complejos de proteínas de membrana (Mayer *et al.*, 1986). Como polimorfismo lipídico se entiende la capacidad que poseen los lípidos para adoptar diferentes formas o “volúmenes de Van der Waals” dependiendo del área proporcional que represente la cabeza polar y la parte hidrofóbica dentro de la molécula, aunque la morfología que adoptan los lípidos al dispersarse en medios acuosos depende, entre otros, de la temperatura, de la presión, de la fuerza iónica y del pH (Mayer *et al.*, 1986).

El empaquetamiento lipídico en estructuras tridimensionales a pequeña escala se describe generalmente con el parámetro de empaquetamiento p definido como (Israelachvili *et al.*, 1980) $p = v/a \times l$ donde v es el volumen de la cadena(s) hidrocarburada, a el área ocupada por la cabeza polar, y l la longitud máxima de las cadenas hidrocarburadas. De acuerdo a esto, se forman micelas convencionales esféricas cuando la molécula adopta preferentemente una forma cónica, i.e. $p < 1/3$, y las micelas no esféricas se forman cuando la geometría molecular se asemeja a un cono truncado con $1/3 < p < 1/2$ (Figura 5). Alternativamente, cuando existe un área grande de cabeza polar comparado al área ocupada por la cadenas acílicas puede llevar a la bicapa a una fase de cadenas interdigitadas, ya que como coste energético de exponer las cadenas acílicas a la fase acuosa se equilibra con una separación de los grupos polares voluminosos (Pascher *et al.*, 1992). El modo de empaquetamiento lipídico más importante biológicamente, la bicapa lipídica, requiere una forma molecular más o menos cilíndrica con $1/2 < p < 1$. Si $p > 1$ se

forman estructuras invertidas con curvatura negativa espontánea (p. ej. micelas invertidas o fases hexagonales).

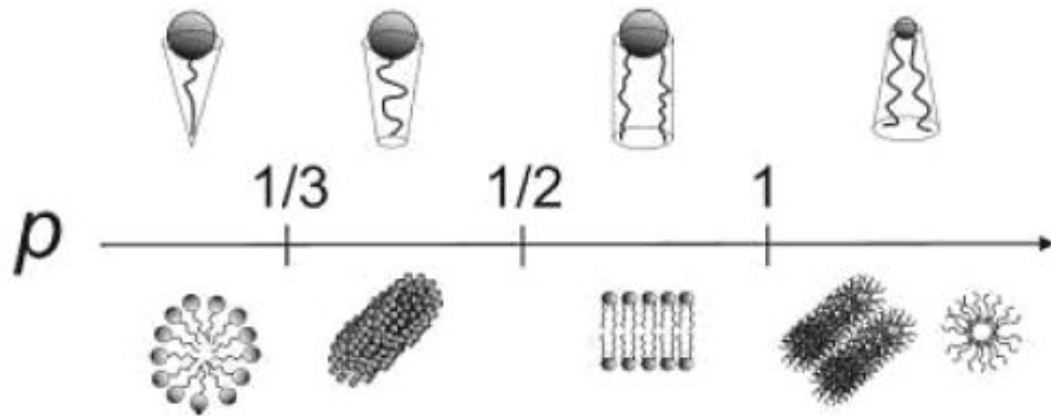


Figura 5. Esquema ilustrativo del impacto del parámetro de empaquetamiento p en el ensamblado lipídico formado en disolución acuosa.

Las fases lipídicas también pueden clasificarse según el tipo de red u organización de largo alcance, según el orden de las cadenas acílicas (fluidas o extendidas) y según la curvatura de la fase (normal o inversa). La nomenclatura más ampliamente utilizada es la propuesta por Luzzati (Nieva *et al.*, 1995), que se compone de una letra y un subíndice. En primer lugar, el tipo de orden de largo alcance se indica con una letra mayúscula: L significa unidimensional (lamelar), H bidimensional (hexagonal), P bidimensional oblicua, Q tridimensional cúbica y C tridimensional cristalina. La conformación de las cadenas hidrocarbonadas se indica mediante un subíndice formado por una letra griega: α se refiere a cadenas acílicas desordenadas (fluido), β ordenadas (gel) y β' ordenadas inclinadas. Además, la organización lipídica puede ser de tipo I, cuando los elementos estructurales (lamelar, hexagonal, etc.) están rellenos con las cadenas acílicas del lípido (interior hidrofóbico), o de tipo II (invertidas) cuando el disolvente acuoso está rodeado por una matriz hidrofóbica (interior hidrofílico). Las estructuras lipídicas de mayor relevancia biológica son las estructuras lamelares, hexagonales y cúbicas.

Las fases lamelares (L) o bicapas son estructuras periódicas en una dimensión que se pueden dividir, a su vez, en varios tipos de fases. Las más importantes son la fase gel y la fase fluida (Figura 6).

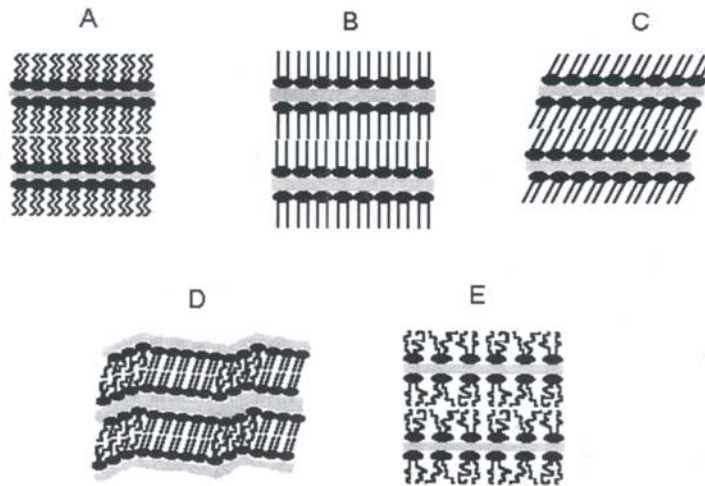


Figura 6. Disposición molecular propuesta para diferentes fases lamelares. (A) fase fluida líquida-cristalina, L_c ; (B) fase gel normal (L_β); (C) fase gel inclinada ($L_{\beta'}$); (D) fase ondulada P_β , y (E) fase líquido-cristalina, L_α (Marsh, 1980).

En la fase gel, las cadenas acílicas de los lípidos están rígidas y se empaquetan en redes bidimensionales cuasi-hexagonales, que se pueden disponer de tres formas diferentes: paralelas a la normal de la bicapa (L_β), inclinadas ($L_{\beta'}$), o interdigitadas ($L_{\beta I}$) (Marsh, 1980). La fase lamelar fluida (L_α), también denominada líquido-cristalina o líquido desordenada, se caracteriza por el desorden de las cadenas acílicas. En la fase L_α las moléculas difunden con mayor rapidez en el plano de la bicapa que en la fase gel y, además, aumenta el área superficial por molécula de lípido y disminuye la anchura de la bicapa.

La fase hexagonal (H) es una estructura fluida periódica en dos dimensiones que consiste en cilindros paralelos empaquetados hexagonalmente y con una longitud mucho mayor que las dimensiones del lípido (tiende a una longitud infinita) (Figura 7). Las fases hexagonales más simples y mejor definidas son la normal e invertida H_I y H_{II} . En la fase H_I los lípidos agregan en micelas circulares cilíndricas que se empaquetan en una red hexagonal, con una región continua de agua que ocupa el volumen entre los cilindros. En la fase invertida (H_{II}) por otro lado, los cilindros contienen núcleos de agua rodeados por

las cabezas polares del fosfolípido, con el restante volumen ocupado completamente por las cadenas hidrocarbonadas. A pesar de que la fase H_I es muy común en sistemas surfactantes simples, no suele formarse en diacil-fosfolípidos. La fase H_{II} , sin embargo, es muy común en lípidos como la fosfatidiletanolamina, con cabezas polares pequeñas y débilmente hidratadas con interacciones atractivas entre ellas (de Kruijff, 1997, Epan, 1998).

Las fases cúbicas (Q) son estructuras periódicas en tres dimensiones (Figura 7). Estas fases pueden ser detectadas fácilmente por microscopía de polarización, puesto que son ópticamente isotrópicas y muy viscosas, al contrario que las fases anisotrópicas o soluciones micelares. Las fases cúbicas pueden ser bicontinuas, cuando la red tridimensional es continua en lípido, o discontinuas, cuando la continuidad es de la fase acuosa (Nieva *et al.*, 1995).

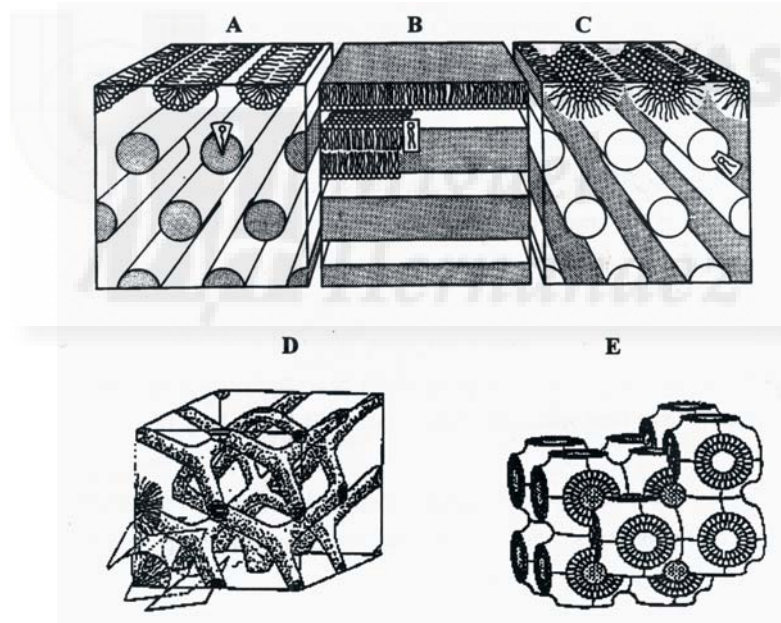


Figura 7. Representación de las estructuras propuestas para las diferentes fases que pueden presentar los lípidos hidratados. (A) Fase hexagonal normal, (B) fase lamelar, (C) fase hexagonal invertida, (D) fase cúbica bicontinua Q224 y (E) fase cúbica bicontinua Q228. (Epan, 1998)

La temperatura es un factor determinante de la fase en la que se encuentra el lípido. Esto es debido a que cada fosfolípido tiene una temperatura de fusión (T_m) característica, que es la temperatura a la que el lípido cambia su estado de fase, pasando de un estado

ordenado tipo gel a un estado menos ordenado tipo líquido-cristalino que es el que usualmente está presente en las membranas biológicas. Los lípidos que se empaquetan de manera más compacta tienen mayores T_m , mientras que los lípidos que favorecen una fase fluida tienen menores T_m . La T_m de un lípido es altamente dependiente de la estructura de sus cadenas acílicas. La T_m aumenta cuanto mayor es la longitud de las cadenas y su grado de saturación, mientras que disminuye conforme aumenta el grado de insaturación, ya que los dobles enlaces en posición *cis* interfieren con el empaquetamiento lateral. Otro factor que afecta a la T_m es la cabeza polar, por ejemplo, los glicosfingolípidos tienden a tener mayores T_m que los esfingolípidos (Hinz *et al.*, 1991), debido a los enlaces de hidrógeno que se forman entre las cabezas polares de los glicosfingolípidos.

1.4. Estructura de la bicapa lipídica

La estructura lamelar de las bicapas lipídicas es la conformación lipídica más habitual presente en las membranas biológicas. Las bicapas fluidas se dividen en una región interfacial y en una región central hidrocarbonada. En base a la estructura del 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC) en fase $L\alpha$, determinada por cristalografía de rayos X (Mohanty *et al.*, 2003), se ha determinado la distribución promediada de los grupos cuasi-moleculares que componen el fosfolípido a lo largo del eje transmembranal (Figura 8).

En la Figura 8 se puede observar como el espacio que abarca la interfase es aproximadamente el mismo que ocupa la región hidrofóbica (alrededor de 30\AA). La región de la interfase está compuesta por una mezcla compleja de agua, fosforilcolina, glicerol, carbonilos y grupos metileno, que ofrecen muchas posibilidades para formar interacciones no covalentes con péptidos y proteínas. La distribución del agua comienza a partir de la región del glicerol más cercana al centro de la bicapa y se hace máxima a medida que se aleja de la bicapa. El grosor de la interfase de cada una de las dos hemicapas de la bicapa (también denominadas monocapas) es de aproximadamente 15\AA , que tiene un tamaño suficiente como para acomodar una hélice α (diámetro $\sim 10\text{\AA}$) dispuesta de forma paralela a la bicapa. Las interfases presentan una gran heterogeneidad química y tienen un gradiente de polaridad, que se reduce hacia el centro de la bicapa. Por lo tanto, la heterogeneidad

química y los gradientes de polaridad que caracterizan a las interfases de las bicapas las convierten en un lugar ideal para que se produzcan interacciones con proteínas de membrana no constitutivas (White and Wimley, 1998).

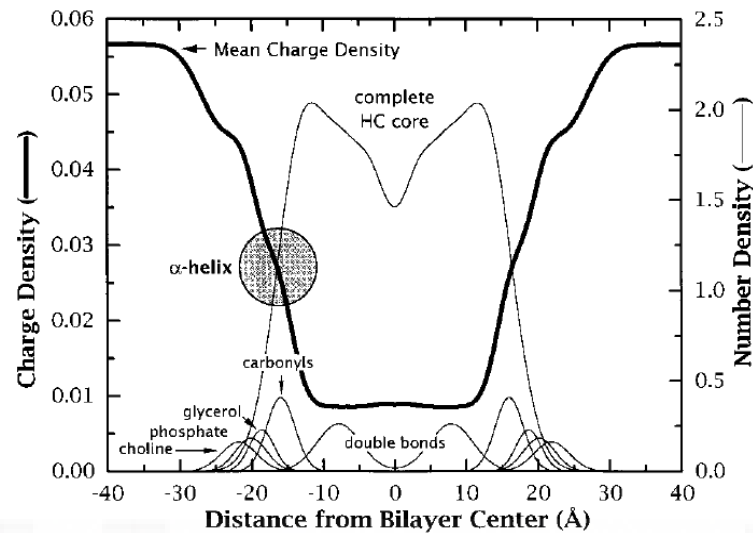


Figura 8. Perfil de polaridades (línea gruesa) y distribuciones de los grupos cuasi-moleculares (líneas delgadas) en la estructura lamelar de la DOPC. La polaridad de la membrana es el promedio compensado de la densidad de carga parcial de los grupos que componen la bicapa. Las distribuciones de los grupos cuasi-moleculares representan la probabilidad de encontrar un grupo estructural en una región en particular. El círculo relleno representa una hélice α colocada de forma paralela a la superficie de la bicapa.

1.5. Procesos de fusión de membranas

La fusión de membranas es un fenómeno universal que se ha incorporado a muchos procesos biológicos durante la evolución. Las reacciones de fusión de membranas están implicadas en multitud de procesos biológicos fundamentales, a pesar de las fuertes barreras energéticas implicadas, debidas a fuerzas de repulsión electrostáticas, de hidratación y de tipo estérico que están presentes en estos procesos (Chernomordik and Kozlov, 2003). En los sistemas biológicos, estas barreras energéticas se superan mediante el uso de proteínas de fusión, cuya función es disminuir la energía de activación del proceso. Se pueden distinguir al menos tres tipos de fusión:

-Fusión extra- e intracelular de organismos patógenos con las células huésped, como es el caso de los virus con envuelta, cuya membrana fusiona con la membrana celular mediante proteínas de fusión presentes en la membrana viral.

-Fusión extracelular de células eucariotas, como la fusión de los espermatozoides con los ovocitos o la formación de sincitios en las células musculares.

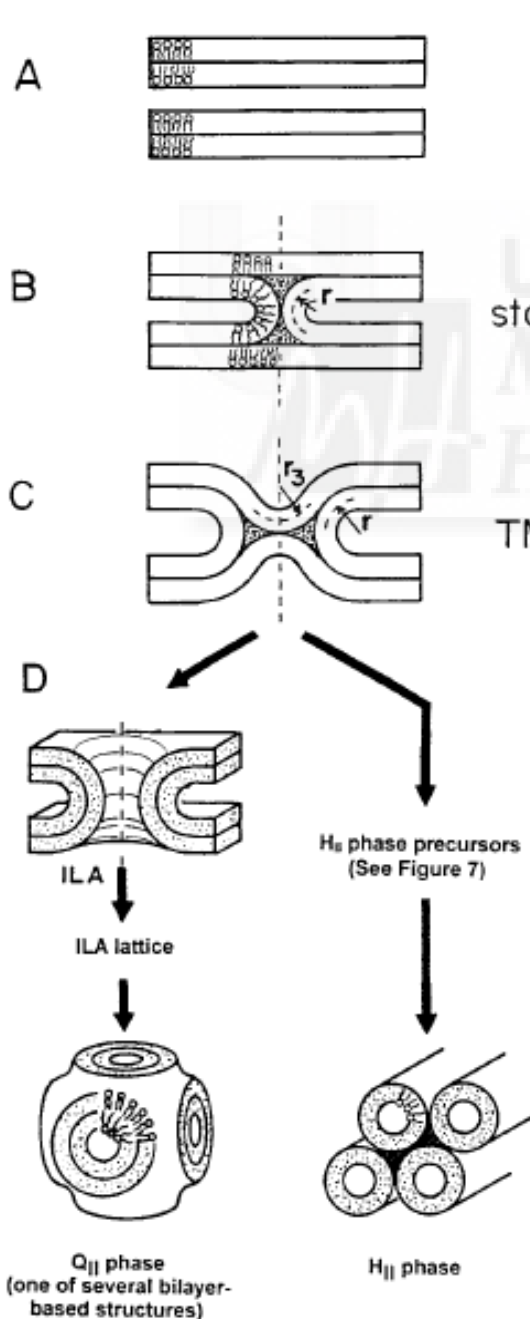
-Fusión intracelular de organelas. Estos procesos están mediados por complejos de proteínas pertenecientes a familias altamente conservadas, como por ejemplo, las proteínas del complejo SNARE, que participan en el proceso de la sinapsis.

A pesar de esta diversidad, todas las reacciones de fusión incluyen un proceso elemental que consiste en el contacto entre ambas membranas, la fusión de las membranas y la apertura de un poro de fusión (Lang *et al.*, 2001). En primer lugar, las membranas deben aproximarse entre sí, superando las fuerzas electrostáticas que tienden a mantenerlas separadas, para que los lípidos de las hemicapas externas puedan interactuar. En segundo lugar, la interfase entre las regiones hidrofílica e hidrofóbica debe ser desestabilizada. Por último, se generan estados de transición no-lamelares que culminan en la apertura del poro de fusión. Todos los estados de transición están gobernados por fuerzas que minimizan la exposición de las superficies no polares al agua y necesitan ser superadas para alcanzar los estados de transición metaestables que conducen a la fusión. Las membranas biológicas utilizan proteínas de fusión específicas para alcanzar este objetivo. Cómo estas proteínas consiguen fusionar membranas es uno de los principales enigmas de la biología celular. Se han propuesto dos vías de acción opuestas que sugieren que el poro inicial puede ser principalmente proteico o lipídico. En el primer caso, el poro estaría formado por una proteína que atraviesa ambas membranas y formaría un anillo proteico que comunicaría el interior de ambas. Las proteínas actuarían sobre los lípidos en los puntos de contacto mediante la formación de estructuras diferentes a la bicapa que no podrían formarse en ausencia de estas proteínas. En el segundo caso, la fusión estaría mediada principalmente por los fosfolípidos, siendo el único papel de las proteínas implicadas el de disminuir la energía de activación del proceso y el organizar espacialmente el lugar de la fusión. Este

modelo asume que el poro esta formado por fosfolípidos y que su formación debe estar en concordancia con las leyes físicas determinantes de las fases lipídicas (Lang *et al.*, 2001).

De acuerdo al segundo caso de fusión comentado, se han descrito varias versiones de un modelo de fusión conocido con el nombre de modelo de tallo (*stalk*) (Kozlov *et al.*, 1989, Siegel, 1999, Siegel, 1993), el cual relaciona la fusión de membranas con el polimorfismo lipídico (Figura 9).

Figura 9. Representación del modelo de tallo modificado de la fusión de membrana. (Siegel, 1999).



(A) Bicapas en fase L_α .

(B) Tallo. El tallo es cilíndricamente simétrico sobre el eje bicontinuo vertical. Está compuesto solamente de lípidos de la monocapa *cis* de las dos bicapas.

(C) Contacto de monocapas *trans* (TMC, *trans monolayer contact*) o intermediario de hemifusión.

(D) Las TMCs pueden formar dos tipos diferentes de estructuras. Si el diagrama de la bicapa en la mitad de la TMC se rompe, se forma un poro de fusión, también conocido como lugar de acoplamiento interlamelar (ILA, *Interlamellar attachment*). A la izquierda: se muestra una sección a lo largo de un ILA. Si los ILAs se acumulan forman entramados de ILA, los cuales se disponen en fases cúbicas Q_{II} . A la derecha: para sistemas próximos al límite de las fases L_α/Q_{II} , los TMCs pueden agregar para formar precursores de fases H_{II} .

Según el modelo original de tallo (Kozlov *et al.*, 1989) la propensión que tienen las bicapas lipídicas para fusionar se basa en la capacidad que tienen las monocapas que las constituyen de doblarse o flexionarse, siendo las membranas más fusogénicas las que poseen curvatura negativa y positiva espontánea en las monocapas *cis* y *trans*, respectivamente (Basanez, 2002).

Trabajos posteriores (Siegel, 1993) sugieren que el modelo de tallo original se contradice, ya que la estructura propuesta tendría regiones de baja densidad de lípido resultantes del espacio que queda libre entre las monocapas *cis* y *trans*. Estos espacios son energéticamente muy desfavorables de mantener, ya que requieren alta energía para crear una cavidad hidrofóbica dentro de las membranas fusogénicas, muy similar a la energía que promueve la transición de la fase lamelar a la fase H_{II}. Se piensa que dichas cavidades hidrofóbicas no favorecen la expansión de la región hemifusionada, por lo que el tallo se estancaría en una estructura local altamente hemifusionada, donde sólo existirían contactos de las monocapas *trans* (TMC, *trans monolayer contact*). Para favorecer la formación del poro, el intermediario TMC debería reconfigurarse para dar lugar a un acoplamiento interlamelar (ILA, *Interlamellar attachment site*), el cual vendría gobernado por la ruptura de tensión de la bicapa, la cual depende de la composición lipídica. De acuerdo con los cálculos realizados por Siegel, el poro de fusión (formación de ILA) se favorecería cuando las monocapas *trans* poseyeran curvatura espontánea negativa (Siegel, 1993, Siegel, 1999), no curvatura espontánea positiva como se propone en el modelo original de tallo (Kozlov *et al.*, 1989). Además, Siegel plantea que los ILAs son los precursores de las fases bicontinuas Q_{II}, y que el mecanismo de formación de los intermediarios de fusión es similar al mecanismo de formación de los precursores de las fases bicontinuas Q_{II} (Siegel, 1999). Estas consideraciones son consistentes con la alta fusogenidad de sistemas de membrana con curvaturas espontáneas negativas en ambas monocapas, y con la tendencia de tales dispersiones lipídicas para formar fases bicontinuas Q_{II}.

La hipótesis del tallo está apoyada por un gran número de evidencias que muestran que tanto la fusión viral como la de los liposomas se ve favorecida por la presencia en la cara *cis* de lípidos con tendencia natural a adoptar curvatura negativa (ejemplo, por PEs). La inclusión de fosfolípidos que disminuyesen los niveles de energía de los vacíos creados

en los intermediarios de fusión (ejemplo, por largas cadenas acílicas), estabilizaría el estado de transición y favorecería la formación de un diafragma. Del mismo modo, compuestos que favorecen la formación de curvatura positiva (ejemplo, LPCs) son capaces de inhibir la fusión de membranas (Basanez, 2002). Recientemente se ha podido tener la primera evidencia de estructura del tallo o de TMC por análisis de tomografía electrónica de una delgadísima sección cónica de muestras de zonas activas de sinapsis corticales de rata (Zampighi *et al.*, 2006).

En resumen, el papel de los catalizadores de la fusión es acelerar este proceso, es decir, disminuir la energía de activación de la fusión. La desestabilización de la bicapa como resultado de la interacción de segmentos de proteínas de fusión con membranas provee un medio de disminuir las barreras energéticas. Un gran número de estudios muestran que péptidos sintéticos capaces de inducir la fusión de liposomas provocan también la desestabilización de la bicapa.

2. Proteínas de fusión víricas

Las glicoproteínas de la envuelta de los virus son las “máquinas” proteicas fusogénicas mejor entendidas. Las proteínas de fusión de los virus tienen un número de características comunes (Basanez, 2002):

- 1- Las proteínas sufren un proceso de maduración resultando en estructuras metaestables, preparadas para un cambio conformacional a estados más estables tras recibir la apropiada señal (bajada de pH o unión al receptor).
- 2- En el estado fusogénico, las proteínas víricas fusogénicas están formando trímeros, y la agregación de múltiples trímeros ayuda en la formación del poro fusogénico.
- 3- Típicamente cada monómero dentro del oligómero se puede, convencionalmente dividir, en tres segmentos: una parte extraviral, conocida como ectodominio, un dominio transmembrana, y un segmento o tallo citoplasmático.

- 4- En el desencadenamiento de la fusión, regiones del ectodominio se unen a la membrana e incluso algunas de ellas se insertan. De especial relevancia es el péptido de fusión, un péptido relativamente corto, hidrofóbico y bien conservado, indispensable para la fusión.
- 5- El péptido de fusión, escondido dentro del ectodominio, es el primer responsable de la etapa inicial del proceso de fusión, mientras que el dominio transmembrana parece ser fundamental para los últimos pasos de la fusión.

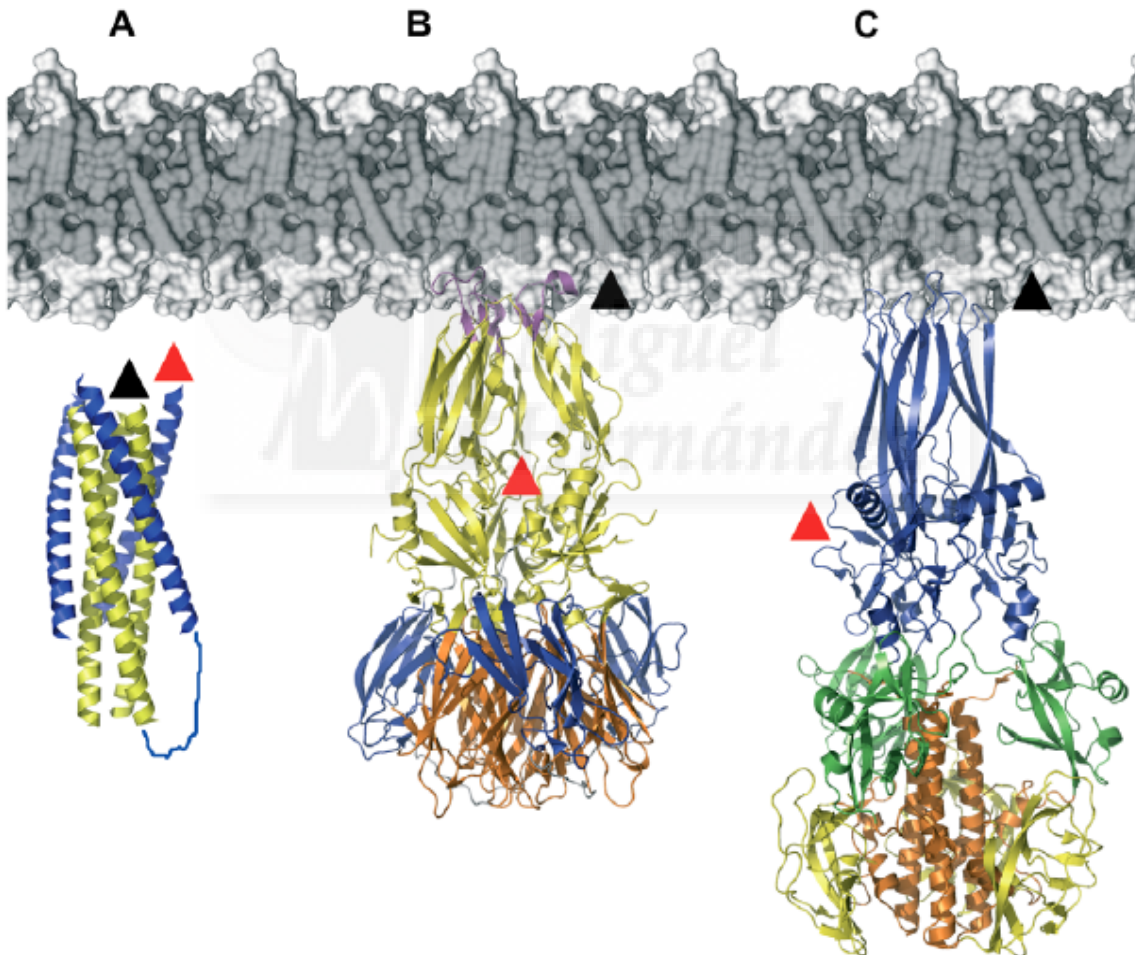


Figura 10. Representación de proteínas virales de fusión de clase I (A), II (B) y III (C) en su conformación propuesta de post-fusión con respecto a la bicapa lipídica. Las posiciones de anclaje a la membrana mediante el péptido de fusión (FP) se indican con flechas negras y la transmembrana (TM) con flechas rojas. Figura A, estructura del ovillo de seis hélices de gp41; Figura B, proteína de fusión E de Flavivirus y Figura C, proteína G de VSV. Los elementos estructurales, los cuales sufren cambio de pre-fusión a post-fusión se muestran con diferentes colores (Figura B y C). Los cambios estructurales de gp41 de la conformación de pre-fusión a post-fusión todavía se desconocen. (Weissenhorn *et al.*, 2007)

Estructuralmente, los ectodominios de las proteínas virales de fusión se pueden clasificar en tres grupos principales (Kielian, 2006, Weissenhorn *et al.*, 2007) (Figura 10):

-Proteínas de fusión de clase I. Su orientación es perpendicular a la membrana del virión. Presentan mayoritariamente hélice α en su estructura secundaria. El estado oligomérico de la forma metaestable y fusogénica está en forma de trímero. Una característica de la estructura del núcleo del ectodominio en su estado post-fusogénico consiste en un ovillo de seis hélices α el cual está formado por un *coiled coil* interno de tres hélices α al cual se acoplan las tres hélices α CHR de forma antiparalela ocupando las cavidades del *coiled coil*. Estas proteínas fusogénicas de clase I se sintetizan como homotrímeros en forma de un precursor inmaduro que se escinde para dar lugar a una subunidad de unión al receptor y la subunidad fusogénica, que posee el péptido de fusión en o cerca del N-terminal. Algunas proteínas de fusión de clase I serían las pertenecientes a las familias orthomixovirus (ej., virus de la gripe), retrovirus (ej., HIV), filovirus (ej., virus del Ébola), paramixovirus (ej., virus Sendai), coronavirus (ej., SARS-CoV).

- Proteínas de fusión de tipo II. A diferencia de las anteriores, su orientación es paralela a la membrana del virión. Presentan cadenas polipeptídicas casi exclusivamente plegadas en hojas β antiparalelas. El estado oligomérico de la forma metaestable está en forma de dímero, mientras que el estado fusogénico está en forma de trímero. Otra diferencia estaría en el paso de maduración de las dos proteínas fusogénicas, que consiste en un corte proteolítico de una proteína inmadura para dar lugar a las dos proteínas fusogénicas, las cuales heterodimerizan por interacciones no covalentes. Y, por otra parte, el péptido de fusión se localiza en un bucle del interior de la secuencia primaria, a diferencia de las de tipo I. Algunos ejemplos de proteínas de fusión de clase II serían las pertenecientes a las familias flavivirus (ej., HCV) o alfavirus (ej., *Semliki forest virus*).

- Proteínas de fusión de tipo III. Son proteínas descritas recientemente (Roche *et al.*, 2007, Roche *et al.*, 2006) que presentan ciertas similitudes con las proteínas de fusión pertenecientes a los otros dos grupos, como por ejemplo, estar glicosiladas, formar homotrímeros en la superficie del virión y sufrir cambios conformacionales a pH ácido que facilitan el proceso de fusión. Sin embargo, y a diferencia del resto de proteínas de fusión,

los cambios conformacionales inducidos por el pH son reversibles, no es necesaria la proteólisis para que la proteína sea activa en la fusión, no contiene un péptido de fusión altamente hidrofóbico en la región N-terminal (proteínas de fusión clase I), ni interno (proteínas de fusión clase II). Al igual que las proteínas de fusión de clase I forma una estructura en horquilla de seis hélices α en su conformación post-fusogénica. Por otra parte, al igual que las proteínas de fusión de clase II presentan bucles y conformaciones en hoja β . Un ejemplo de proteína de fusión de clase III sería la perteneciente a la familia *rabdovirus* (ej., Virus de la estomatitis vesicular G).

3. Síndrome respiratorio agudo severo (SARS²)

El 14 de Marzo del 2003 la Organización Mundial de la Salud (OMS) dio la voz de alarma por el brote de una nueva neumonía atípica en el Sureste asiático, designada como síndrome respiratorio agudo severo (SARS). El virus se extendió rápidamente desde Hong Kong a Singapur, Vietnam y Canadá y desde aquí al resto del mundo. A mediados de Junio de 2003 el virus se había extendido a 32 países con 8460 casos detectados y 799 víctimas mortales.

Tras el brote inicial de SARS, una red de laboratorios en todo el mundo intentó conseguir la identificación del agente causal. El extraordinario esfuerzo de colaboración entre laboratorios dio como resultado que en pocas semanas se descubriera que el causante de la enfermedad era un Coronavirus (Ksiazek *et al.*, 2003, Rota *et al.*, 2003, Kuiken *et al.*, 2003), y más concretamente el SARS-CoV, en poco tiempo más se logró secuenciar todo el genoma del virus (Marra *et al.*, 2003).

SARS es un tipo de neumonía viral con síntomas que incluyen: fiebre, tos seca, disnea, dolor de cabeza, etc. La muerte resulta del fallo respiratorio progresivo debido al daño alveolar. El virus entra al organismo a través de los ojos, nariz y boca. Se puede transmitir por contacto de objetos contaminados con el virus o de persona a persona. El período de incubación del virus del SARS es de unos 6,4 días y el porcentaje de mortalidad

² Las siglas SARS proceden del inglés *severe acute respiratory syndrome*; a lo largo de la tesis se utilizarán las siglas en inglés que es con el nombre que se conoce a la enfermedad.

es de un 13,2% para pacientes con menos de 60 años y de 43,3% para pacientes mayores de 60 años.

3.1. Taxonomía de coronaviridae

Los coronavirus son virus con envuelta con RNA de cadena positiva y genomas que van desde 27,6 a 31,6 kb, los mayores de todos los virus de RNA conocidos (Bournsnel *et al.*, 1987, Eleouet *et al.*, 1995, Herold *et al.*, 1993, Lai and Cavanagh, 1997, Lee *et al.*, 1991). Pertenecen al orden de los Nidovirales, junto con las familias *Arteviridae* y *Roniviridae*. La familia *Coronaviridae* contiene los géneros coronavirus y torovirus. A pesar de las claras diferencias en la arquitectura del virión y su complejidad genética, los coronavirus, torovirus y arterivirus son muy similares en organización genómica y estrategia replicativa. El nombre Nidovirales (del latín *nidus*, que significa nido) se refiere a que estos virus sintetizan una serie de 3' co-terminales RNAm subgenómicos durante la infección de la célula huésped agrupados en nidos (Cavanagh 1997). Los coronavirus deben su nombre por su apariencia de corona en las imágenes de microscopía electrónica debida a sus púas en forma de pétalo que sobresalen de la envuelta del coronavirus (Figura 11). Existen tres grupos de coronavirus clasificados en base a sus propiedades serológicas y genéticas. Dos de los grupos están compuestos por coronavirus de mamíferos, mientras que los coronavirus de aves forman un tercer grupo (Tabla 1). El virus de la hepatitis murina (MHV) es el prototipo del grupo 2 de los coronavirus, aunque algunos virus de este grupo son coronavirus de humanos. El análisis genómico del coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) ha demostrado que es un grupo filogenéticamente divergente de los tres grupos antigénicos de coronavirus (Drosten *et al.*, 2003, Ksiazek *et al.*, 2003). Sin embargo, el análisis del gen de la polimerasa indica que el SARS-CoV podría ser un subgrupo que se separó pronto del grupo 2 de los coronavirus (Snijder *et al.*, 2003).

Tabla 1. División de los coronavirus en grupos.

Grupo	Virus	Huésped	Enfermedad principal
1	Virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV)	Gato	Enteritis/peritonitis
	Virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV)	Cerdo	Enteritis
	Virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV)	Cerdo	Enteritis
	Coronavirus canino (CCoV)	Perro	Enteritis
	Coronavirus humano (HCoV)-229E	Humano	Infección respiratoria
	Coronavirus humano (HCoV)-NL63	Humano	Infección respiratoria
	Coronavirus del conejo	Conejo	Enteritis
2a	Virus de la hepatitis del ratón (MHV)	Ratón	Hepatitis/encefalitis/enteritis
	Coronavirus bovino (BCoV)	Vaca	Enteritis
	Virus de la encefalomielitis hemaglutinante (HEV)	Cerdo	Infección respiratoria
	Coronavirus equino (ECoV)	Caballo	Enteritis
	Coronavirus de la rata (RCoV)	Rata	
	Coronavirus humano (HCoV)-OC43	Humano	Infección respiratoria
	Coronavirus humano (HCoV)-HKU1	Humano	Infección respiratoria
2b	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV)	Humano	Infección respiratoria
3	Virus de la bronquitis infecciosa (IBV)	Pollo	Infección respiratoria
	Coronavirus del pavo	Pavo	Infección respiratoria

3.2. Arquitectura del virión y organización genómica

Las partículas del coronavirus son más o menos esféricas y miden unos 80-120 nm de diámetro. El genoma ARN viral está empaquetado por la proteína de la nucleocápsida (N) (Macneughton and Davies, 1978, Sturman *et al.*, 1980). La cápsida está envuelta por una bicapa lipídica en la cual residen al menos 3 proteínas de membrana. Éstas son la proteína *spike*³ (S) de 180-220 kDa, una glicoproteína de tipo I que forma protuberancias en la superficie viral; la proteína de membrana (M) de 25-30 kDa, una proteína de membrana que la atraviesa tres veces y que es el componente mayoritario de la envuelta viral (Machamer *et al.*, 1993, Machamer *et al.*, 1990, Swift and Machamer, 1991); y la proteína de envuelta (E) de 10 kDa, una proteína muy hidrofóbica que es un consituyente minoritario de la membrana viral (Godet *et al.*, 1992, Vennema *et al.*, 1996, Yu *et al.*,

³ La palabra *spike* es un anglicismo de no muy clara traducción al castellano, significaría púa o pincho, sin embargo a lo largo de la tesis se utilizará el anglicismo para una mayor claridad.

1994) (Figura 11). Además, varios coronavirus poseen una cuarta proteína de envuelta, la proteína esterasa-hemaglutinina (HE).

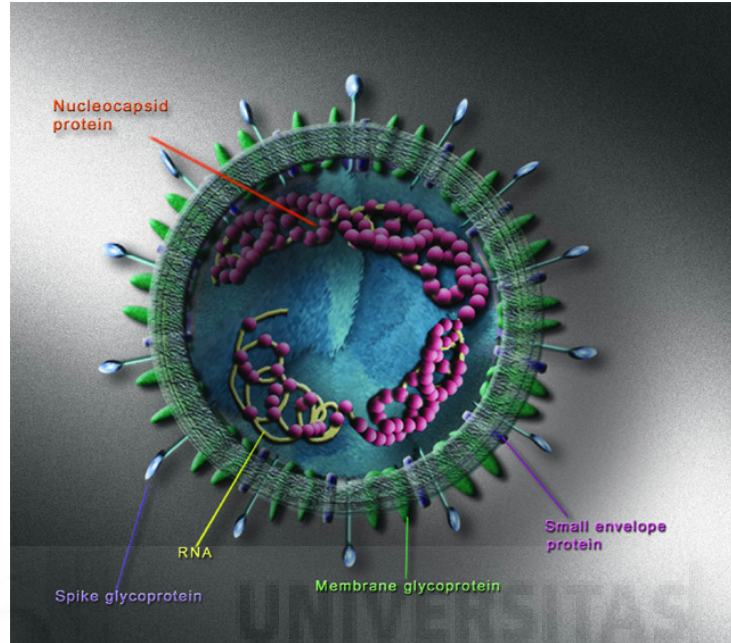


Figura 11. Esquema ilustrativo de las proteínas estructurales del SARS-CoV.

El genoma del SARS-CoV tiene 29727 nucleótidos, más de dos tercios del genoma de los coronavirus está ocupado por dos marcos de lectura abiertos (ORFs), designados como ORF1a y ORF1b, que son traducidos en dos grandes poliproteínas, pp1a y pp1ab. Las poliproteínas son procesadas proteolíticamente por proteasas codificadas por virus para dar lugar a proteínas maduras que llevan a cabo la replicación de ARN y la transcripción. Curso abajo del ORF1b están los genes que codifican las proteínas estructurales, en el orden conservado S-E-M-N, y algunas proteínas accesorias (Figura 12) (Rota *et al.*, 2003).



Figura 12. Representación esquemática del genoma del SARS-CoV. ORF1ab codifica para las replicasas y se muestra en blanco, los genes que codifican proteínas estructurales, S, E, M y N, en gris y los genes de proteínas accesorias 3a/b, 6, 7a/b, 8a/b y 9b se muestran en negro.

3.2.1. Proteínas estructurales

Proteína de la nucleocápsida

La proteína de la nucleocápsida (N) es una proteína muy básica (pI 10.3 – 10.7) con un alto porcentaje de lisinas y argininas, de 50 a 60 KDa. La proteína N de SARS-CoV tiene 422 aminoácidos y tiene sólo un 20-30% de homología con los otros coronavirus (Marra *et al.*, 2003, Rota *et al.*, 2003). La proteína de la nucleocápsida está fosforilada en sus residuos de serina (Stern and Sefton, 1982), aunque se desconoce la función de esta modificación (Stohlman and Lai, 1979, Wilbur *et al.*, 1986). La función primaria de la proteína N es la formación de la nucleocápsida, pero la proteína también juega un papel facilitando la replicación, transcripción, traducción y salida del virus (He *et al.*, 2003, Lai and Cavanagh, 1997, Tahara *et al.*, 1998).

Proteína de membrana

La glicoproteína de membrana (M) es el componente más abundante de la envuelta. Es una proteína integral de membrana tipo III de 221-262 aminoácidos y unos 25 kDa, conteniendo tres segmentos transmembrana en su extremo N-terminal. La proteína M tiene un dominio hidrofílico corto luminal (Armstrong *et al.*, 1984, Locker *et al.*, 1992, Machamer *et al.*, 1993, Routledge *et al.*, 1991) que puede estar N- (grupo 1 y 3) u O-glicosilado (grupo 2). El dominio C-terminal de la proteína M tiene un carácter antipático con la excepción de un dominio hidrofílico corto en el C-terminal. El dominio luminal y el dominio C-terminal hidrofílico son susceptibles a digestión proteolítica. La proteína se inserta en la membrana del RE a través de la acción de una secuencia señal (Rottier *et al.*, 1985) después de ser sintetizada en polisomas unidos a membrana. La proteína M se acumula en el aparato de Golgi y no se transporta a la membrana plasmática (Machamer *et al.*, 1990, Swift and Machamer, 1991). Una de las funciones principales de la proteína M es dirigir la incorporación de la glicoproteína S (Nguyen and Hogue, 1997, Opstelten *et al.*, 1995) y la proteína N (Narayanan *et al.*, 2000) en la partícula de salida del virión.

Proteína de envuelta

La proteína de envuelta E es una proteína pequeña de membrana de unos 76-109 residuos (9-12 kDa) presente en pequeñas cantidades en la envuelta del virión (Godet *et al.*, 1992, Liu *et al.*, 1991, Yu *et al.*, 1994). La proteína E contiene un dominio hidrofóbico relativamente largo en su amino terminal, seguido de una región rica en cisteínas y un tallo corto hidrofílico (Liu and Inglis, 1991). Se ha especulado que la proteína E induce curvatura de la membrana durante la salida del virión (Vennema *et al.*, 1996, Fischer *et al.*, 1998). La proteína de envuelta en SARS-CoV tiene unos 76 aminoácidos de longitud con un peso molecular aproximado de unos 10-15 kDa. Varios estudios de la proteína E del SARS-CoV han mostrado propiedades adicionales que podrían ser específicas del SARS-CoV. La proteína E del SARS-CoV puede formar canales iónicos selectivos de catión (Wilson *et al.*, 2004) similares a los de la proteína M2 del virus de la gripe (Duff and Ashley, 1992, Duff *et al.*, 1994, Pinto *et al.*, 1992), proteínas Vpu del VIH (Ewart *et al.*, 1996) y VPr (Piller *et al.*, 1996) y proteína p7 de la hepatitis C (Griffin *et al.*, 2003, Pavlovic *et al.*, 2003, Premkumar *et al.*, 2004, Perez-Berna *et al.*, 2008). Un segmento de la proteína E del SARS-CoV parece formar tres puentes disulfuro con las correspondientes cisteínas de otro segmento en el carboxi-terminal de la glicoproteína S (Wu *et al.*, 2003). Además, la proteína E forma una horquilla en hélice transmembrana palindrómica alrededor de un pseudo-centro de simetría no identificado previamente (Arbely *et al.*, 2004, Khattari *et al.*, 2006). A través de la acción de esta horquilla la bicapa lipídica sufriría una deformación, aumentando la curvatura de la membrana, que podría ser una explicación molecular del papel de pivote de la proteína E en la salida del virus (Arbely *et al.*, 2004).

Glicoproteína hemaglutinina-esterasa

Aunque no se ha encontrado en el SARS-CoV, en algunos coronavirus está presente otra proteína denominada glicoproteína hemaglutinina-esterasa (HE) (Rota *et al.*, 2003). Tiene unos 424 a 429 aminoácidos de longitud y suele presentarse como un homodimero de 65 a 70 kDa en algunos viriones del grupo II de los coronavirus. La HE podría intervenir en la entrada del virus o salida de éste de células infectadas.

Glicoproteína S

La proteína *spike* (S) es la responsable de la unión del virus a la célula huésped y es el encargado de producir la fusión de sus membranas. La glicoproteína S del SARS-CoV es una glicoproteína transmembrana de 1255 aminoácidos de longitud (~500 KDa), con dos dominios (Figura 13); el dominio globular y el dominio externo largo, el cual a su vez contiene dos subdominios: la secuencia transmembrana y el pequeño dominio interno. En la proteína S se pueden distinguir dos dominios funcionales (Figura 13): el S1, con un plegamiento globular que da al virus sus propiedades antigénicas y que contiene el sitio de unión para el receptor de la superficie celular (Xiao *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2004, Wong *et al.*, 2004, Babcock *et al.*, 2004) y el S2, que contiene zonas de heptadas repetidas y es el responsable de la fusión celular (Rota *et al.*, 2003).

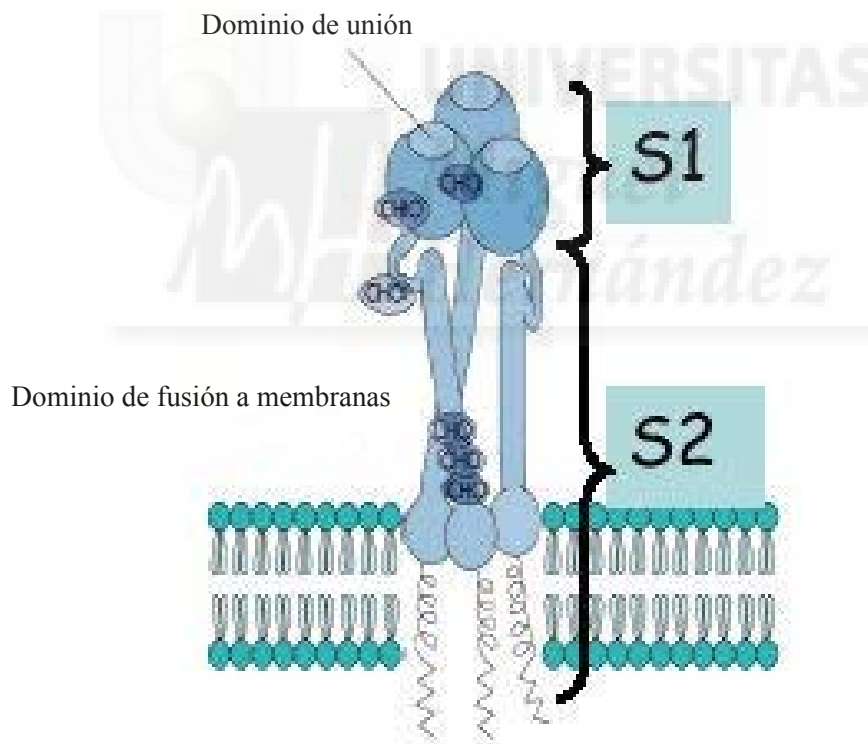


Figura 13. Esquema de la glicoproteína S del SARS-CoV mostrando sus dos dominios y su posición en la membrana viral. Se indica la región de unión al receptor (S1) y la zona implicada en la fusión (S2).

En algunas especies de coronavirus, la glicoproteína se corta por una proteasa para dar dos subunidades no asociadas, S1 y S2, las cuales tienen diferentes funciones (Frana *et*

al., 1985). Sin embargo, la escisión no es un requerimiento esencial para el mecanismo de fusión y los datos disponibles sugieren que aunque la glicoproteína S del SARS-CoV puede cortarse en dos subunidades (Wu *et al.*, 2004), no es un requerimiento absoluto para la fusión (Follis *et al.*, 2006, Simmons *et al.*, 2004). Las predicciones mediante análisis teórico de las secuencias, los estudios de mapeo sistemático de aminoácidos y estructuras de cristalografía de rayos X del dominio S2 han localizado la región HR1 en los aminoácidos 892-980, mientras que la región HR2 se extendería desde los aminoácidos 1145-1184 (Bosch *et al.*, 2004, Rota *et al.*, 2003, Tripet *et al.*, 2004, Zhu *et al.*, 2004, Ingallinella *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2004).

3.2.2. Proteínas no estructurales

El gen de la replicasa del SARS-CoV codifica 16 proteínas no estructurales con múltiples funciones enzimáticas (Snijder *et al.*, 2003). Algunas son enzimas que son componentes comunes de la maquinaria replicativa de virus ARN de cadena positiva; una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp, nsp12); una serin proteasa similar a 3C (M^{pro} o $3CL^{\text{pro}}$, nsp5); un proteasa 2 similar a papaina ($PL2^{\text{pro}}$, nsp3) y una helicasa de la superfamilia 1 (HEL1, nsp13) (Marra *et al.*, 2003, Thiel *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2003). Además, el gen de la replicasa codifica proteínas que son indicativas de actividad exoribonucleasa 3' – 5' (homóloga a ExoN, nsp14), endoribonucleasa (homóloga a XendoU, nsp15), fosfatasa adenosin difosfato ribosa 1' (ADRP, nsp3) y ribosa 2'-*O*-metiltransferasa (2'-*O*-MT, nsp16). Por último, el gen de la replicasa codifica otras nueve proteínas, de las cuales poco se sabe sobre su estructura o función. Las nsp 4, 10 y 16 han sido implicadas por análisis genético en el ensamblaje de una replicasa funcional con un complejo transcriptasa.

3.2.2. Proteínas accesorias.

A diferencia de otros coronavirus, SARS-CoV presenta además de los genes conservados comentados anteriormente, ocho nuevos ORFs en el extremo 3' (ORFs 3a, 3b, 6, 7a, 8a, 8b y 9b) (Snijder *et al.*, 2003, Bartlam *et al.*, 2005). Cuatro de estas proteínas accesorias se expresan durante la infección y se incorporan en el virión, ORF3a (Ito *et al.*,

2005, Shen *et al.*, 2005, Yu *et al.*, 2004), ORF6 (Geng *et al.*, 2005), ORF7a (Huang *et al.*, 2006) and ORF7b (Schaecher *et al.*, 2007). La proteína codificada por ORF3a tiene tres dominios transmembrana, se localiza en regiones perinucleares en la célula, pero también en la membrana plasmática desde donde puede ser endocitada (Ito *et al.*, 2005, Tan *et al.*, 2004, Yuan *et al.*, 2005). La proteína ORF3a interactúa con las proteínas estructurales M, E y S, así como con la proteína ORF7a, además se ha observado que forma canales sensibles a potasio lo cual podría promover la liberación del virus (Lu *et al.*, 2006). Se ha demostrado que las proteínas codificadas por ORF3b y ORF6 antagonizan con el interferón, un componente clave en la respuesta inmune innata (Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007). ORF7a codifica una proteína que podría ser una proteína de membrana tipo I con una secuencia señal de escisión en el C-terminal de anclaje a membrana (Fielding *et al.*, 2004). En virus aislados de animales como en los primeros aislados de humanos se observaba un ORF8 continuo, mientras que en las fases media y tardía de la epidemia los virus contenían una delección de 29 nucleótidos que creó dos ORFs, denominados ORF8a y ORF8b (Chinese, 2004, Guan *et al.*, 2003). Solamente los virus con esta delección se extendieron de forma efectiva entre la población de humano a humano. Según estudios recientes (Oostra *et al.*, 2007) la proteína completa ORF8ab sería una proteína funcional en animales, sin embargo habría perdido su función al transmitirse a humanos dando lugar a dos proteínas no funcionales. Finalmente, el ORF9b está localizado con el gen de la nucleocápsida, aunque no se sabe si se trata de una proteína estructural.

3.3. Origen del SARS-CoV

Se supone que el SARS-CoV surgió de una fuente animal, cruzando la barrera entre la especie huésped para infectar a humanos. Evidencias serológicas y genéticas de varios estudios apoyan este origen zoonótico del origen del SARS-CoV (Holmes, 2003, Wang *et al.*, 2005b, Wang *et al.*, 2006). Esta hipótesis se basó en primer lugar en los informes epidemiológicos demostrando que los primeros pacientes con SARS en la Provincia de Guangdong habían estado expuestos a animales vivos silvestres en mercados de animales (Zhong *et al.*, 2003). Para identificar los animales con SARS-CoV, se examinaron animales de estos mercados detectándose virus similares a SARS-CoV en gatos de algalia y en mapaches. Además se han observado evidencias de infección por SARS-CoV en

muchas otras especies de mercados en China incluyendo gatos, zorro rojo y una especie de tejón (Guan *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2005a). Según los últimos estudios la fuente primaria de la infección estaría en una especie de murciélago (Lau *et al.*, 2005), siendo los gatos de algalia el intermediario entre éstos y los humanos.

3.4. Receptor

En un primer lugar se identificó como receptor celular de SARS-CoV la enzima convertora de angiotensina 2 (ACE2) (Li *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2004). Recientemente, sin embargo se ha demostrado que existe un receptor adicional, CD209 (LSIGN) (Jeffers *et al.*, 2004).

3.4.1. Enzima convertora de angiotensina 2 (ACE2)

ACE2 es una zinc metaloproteasa presente en el corazón, riñones, testículos, tracto gastrointestinal y pulmones (Kuhn *et al.*, 2004). ACE2 es una enzima importante en la cascada renina-angiotensina y juega un papel esencial en la regulación de la función cardíaca, además se ha observado que ACE2 está altamente expresado en células epiteliales de los alvéolos pulmonares y enterocitos del intestino delgado (To and Lo, 2004, Hamming *et al.*, 2004), localización consistente con la patogénesis de la infección por SARS-CoV. La unión de la proteína S del SARS-CoV a ACE2 produce una disminución de la expresión de la proteína en la superficie de la membrana (Kuhn *et al.*, 2004). Esta disminución contribuiría a la severidad de la patología pulmonar observada tras la infección por SARS-CoV (Imai *et al.*, 2005). La unión del dominio S1 al receptor ha sido demostrada, siendo los aminoácidos 318-510 de S1 el elemento clave en el reconocimiento (Xiao *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2004, Wong *et al.*, 2004, Babcock *et al.*, 2004). El dominio S1 en forma soluble se asocia en un dímero que se une a ACE2 más ávidamente que el monómero. El dominio de dimerización de S1 ha sido mapeado en los aminoácidos 17-217, una región cercana al S1 que es también esencial para la fusión de membranas (Xiao *et al.*, 2004).

3.4.2. Lectinas como receptores potenciales

Se ha observado que varias lectinas tipo C (DC-SIGN/CD209, L-SIGN/CD209L y LSECtin) pueden apoyar la unión a la proteína S (Chan *et al.*, 2006, Gramberg *et al.*, 2005, Jeffers *et al.*, 2004, Marzi *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2004). Aunque se ha visto que la presencia de L-SIGN permite una muy ineficiente entrada y la expresión de lectinas en ausencia de ACE2 no lleva generalmente a la infección, en presencia de ACE2 la entrada se ve incrementada. Las células que expresan DC-SIGN y L-SIGN, también como células dendríticas, que no pueden ser infectadas por si mismas, podrían sin embargo ser capaces de promover la distribución de los virus a células diana susceptibles (Chan *et al.*, 2006, Hofmann and Pohlmann, 2004, Law *et al.*, 2005, Marzi *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2004).

3.5. Entrada del virus a la célula

Después de la unión del virus al receptor celular, el virus entra a la célula bien a través de fusión de membranas directa o bien por endocitosis mediada por receptor dependiente de pH. El dominio N-terminal de la proteína S (S1) contiene el dominio de unión al receptor (RBD), mientras que la parte C-terminal (S2) es la subunidad que se ancla a la membrana y la responsable de la fusión de membranas, además contiene dos regiones de heptadas repetidas (HR1 y HR2).

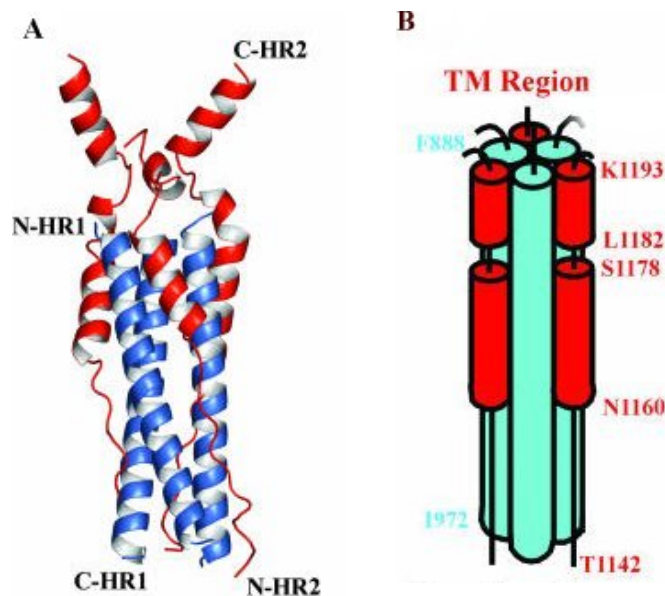
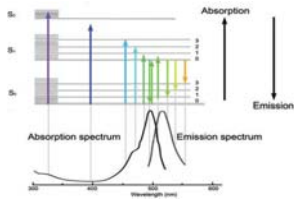


Figura 14. Representación de cintas del complejo HR1/HR2 y modelo de la estructura postfusión del SARS-CoV S2.

En el estado nativo, las proteínas *spike* estarían en la superficie del virus en forma trimérica (Beniac *et al.*, 2006), las regiones HR1 estarían en una conformación desordenada cubiertas por el dominio S1. Después de la unión al ACE2 en las células diana, el dominio S2 cambiaría su conformación formando α -hélices, extendiéndose y insertando su péptido de fusión en la membrana de la célula diana, y exponiendo las regiones HR1 y HR2. Entonces las tres unidades HR1 (aminoácidos 888-972) se asociarían en una estructura en ovillo trimérica y paralela en la cual los tres elementos HR2 (aminoácidos 1142-1193) se unirían en los surcos del complejo HR1 en una dirección oblicua y antiparalela (Supekar *et al.*, 2004) (Figura 14). Este núcleo de fusión activo haría que la membrana viral y la celular quedaran próximas en el espacio, resultando con ayuda de varias regiones del dominio S2, en la fusión entre las membranas y la formación del poro de fusión, lo que permitiría al genoma del virus entrar a la célula diana.





Capítulo



Metodología general



1. Formación de liposomas

Las membranas en forma de bicapas cerradas o liposomas, preparadas a partir de moléculas anfifílicas dispersas en medio acuoso están ampliamente reconocidas como modelos simples de las membranas celulares y como vehículos potenciales para el transporte y liberación de compuestos. Los liposomas se clasifican según su tamaño y morfología (Jones, 1995, Usher *et al.*, 1978) (Figura 1).

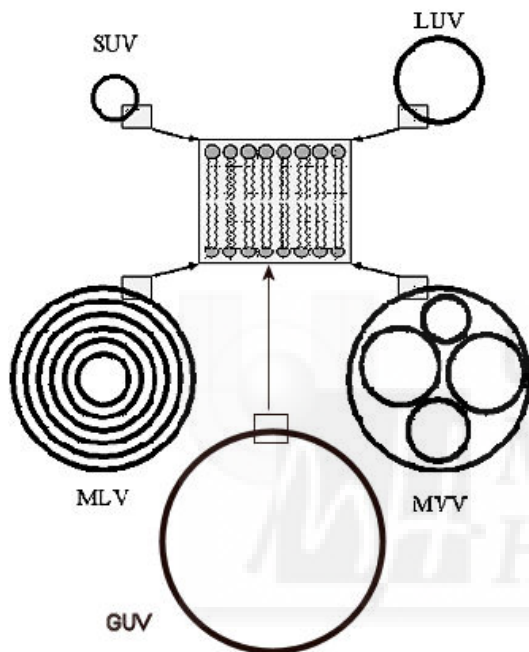


Figura 1. Ilustración esquemática de liposomas de diferente tamaño y número de bicapas lipídicas. SUV (*Small Unilamellar Vesicles*): Vesículas unilamelares pequeñas. LUV (*Large Unilamellar Vesicles*): Vesículas unilamelares grandes. MLV (*Multilamellar Vesicles*): Vesículas multilamelares. MVV (*Multivesicular Vesicles*): Vesículas multivesiculares. GUV (*Giant Unilamellar Vesicles*): Vesículas unilamelares gigantes.

Los cuatro tipos principales de liposomas son:

-Vesículas multilamelares grandes (*Multilamellar Large Vesicles* o *MLVs*). Son estructuras que consisten en bicapas concéntricas que se forman espontáneamente cuando se hidratan lípidos anfifílicos. El diámetro promedio de los MLVs es de unos 700 nm, aunque su tamaño puede variar entre 100 y 5000 nm de diámetro y el número medio de lamelas (bicapas concéntricas) está comprendido entre 7 y 10. Este tipo de liposoma posee la desventaja de que tan solo el 10-15% de los fosfolípidos se encuentra en la bicapa más externa, es decir, que sólo una pequeña fracción de lípidos puede interactuar con agentes externos.

-Vesículas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles* o *LUVs*). Son vesículas de una sola bicapa lipídica, cuyo diámetro oscila entre 50 y 500 nm. Pueden prepararse mediante distintos procedimientos: por diálisis de un detergente en soluciones que contienen lípido, por fusión de SUVs inducida por Ca^{+2} , por evaporación de un disolvente orgánico en fase reversa, por extrusión en prensa francesa o extrusión con filtros de policarbonato, etc.

-Vesículas unilamelares pequeñas (*Small Unilamellar Vesicles* o *SUVs*). Son vesículas consistentes en una única bicapa de lípidos, con un diámetro de entre 20 nm y 50 nm. Se preparan mediante ultrasonicación de suspensiones de MLVs.

-Vesículas unilamelares gigantes (*Giant Unilamellar Vesicles* o *GUVs*). Estas vesículas de una sola bicapa pueden alcanzar diámetros de hasta 300 μm (Mathivet et al., 1996).

Los liposomas mejor caracterizados y de mayor utilidad son los que están compuestos por una sola bicapa de lípido, principalmente los SUVs y LUVs. La mayor diferencia entre estos dos, a parte de su tamaño, reside en la proporción de lípido que hay en las hemicapas interna y externa. En el LUV de ~ 95 nm la distribución es casi simétrica, 50% en cada hemicapa según Mayer et al. (Mayer et al., 1986), o 54% en la hemicapa externa y 46% en la hemicapa interna según Butko et al. (Butko et al., 1996). Sin embargo, el pequeño radio de curvatura de los SUVs fuerza a que una proporción más alta de lípidos se sitúe en la hemicapa externa, entre un 60 y un 70% (Szoka and Papahadjopoulos, 1980). La proporción diferente de lípidos a cada lado de la bicapa tiene una serie de consecuencias: (1) el empaquetamiento de los lípidos de la hemicapa externa es diferente al empaquetamiento de los situados en la hemicapa interna; (2) por calorimetría diferencial de barrido se observa una disminución de la temperatura de transición gel-líquido cristalina un promedio de 4°C , un ensanchamiento de la banda y una reducción de la entalpía; (3) por debajo de la temperatura de transición las cadenas lipídicas de los SUVs se encuentran más desordenadas que en la fase de los LUVs o MLVs; (4) se reduce la movilidad lateral de los lípidos y disminuye la miscibilidad de los lípidos lo que favorece la coexistencia de dominios lipídicos de distinta composición dentro de la bicapa, incluso por encima de la

temperatura de transición (New, 1990). Por lo tanto, los LUVs son los liposomas más apropiados para la realización de estudios biofísicos de interacción lípido-proteína.

Los liposomas comenzaron a utilizarse como sistemas modelos de membranas a partir de los trabajos de Bangham et al. (Bangham *et al.*, 1965a, Bangham *et al.*, 1965b), donde se comprobó mediante microscopía electrónica que los liposomas eran sistemas de membranas cerradas. Desde entonces han sido utilizados ampliamente tanto en ciencia básica como en ciencia aplicada. Las primeras experiencias de estos modelos de membranas estuvieron dirigidas hacia el estudio de la permeabilidad y comportamiento osmótico de las vesículas a algunas sustancias encapsuladas en ellas, utilizándose una gran variedad de composiciones lipídicas así como varios tipos de iones y electrolitos. El uso de los liposomas también ha permitido caracterizar las propiedades físico-químicas de los lípidos en sí y, además, las interacciones del lípido con otras moléculas, ya sean proteicas o no-proteicas, donde hay una infinidad de trabajos al respecto, empleando una gran diversidad de metodologías biofísicas: resonancia de spin electrónico, resonancia magnética nuclear, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía de infrarrojo, fluorescencia, etc.

2. Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja (IR) mide las transiciones de baja energía entre niveles vibracionales dentro de un mismo nivel electrónico, resultantes de la absorción de radiación en la región infrarroja del espectro electromagnético. Estos niveles vibracionales están generados por movimientos característicos (tensión, flexión, aleteo, etc.) que se dan en los diferentes enlaces químicos presentes en los grupos funcionales de una molécula. La escala de tiempos de dichas vibraciones moleculares es muy corta (cerca de 10^{13} s^{-1}). La espectroscopía infrarroja de proteínas ha avanzado enormemente desde las dos últimas décadas, debido a los avances no sólo en la instrumentación, sino también en los métodos de tratamiento y análisis de datos. Una de las grandes ventajas de esta técnica es la facilidad que presenta para adquirir espectros de gran calidad a partir de cantidades muy pequeñas de proteínas ($\sim 100 \mu\text{g}$) (Barth, 2000, Mantsch and McElhaney, 1991). Es más, la espectroscopía infrarroja también permite el estudio de proteínas en medios de elevada

turbidez sin que esto afecte a la resolución de los espectros obtenidos. En este último caso, ésta técnica es, además, especialmente útil para el estudio de las membranas lipídicas (transiciones polimórficas de los fosfolípidos, conformación y dinámica de los fosfolípidos en sus diferentes estados, etc.).

La espectroscopía infrarroja tiene una serie de ventajas que la hacen especialmente útil para el estudio de las interacciones entre proteínas y membranas lipídicas:

- a) En un solo experimento de IR se puede obtener información tanto dinámica como estructural de todas las regiones de las moléculas de lípido, así como de la proteína.
- b) Los espectros se obtienen sin necesidad de usar sondas que podrían perturbar las propiedades de la membrana.
- c) El tamaño de las proteínas estudiadas no es un problema, no hay una limitación de tamaño.
- d) Las muestras se pueden estudiar en una gran variedad de estados (sólido, disolución, películas orientadas, etc).
- e) Se requieren pequeñas cantidades de muestra.

Se puede decir que el mayor salto cualitativo de la espectroscopia de infrarrojo se produjo con la adopción de espectrómetros basados en el interferómetro de Michelson. Una vez que se ha recogido un interferograma, es necesario convertirlo en un espectro. Esto se consigue a través del algoritmo de la transformada de Fourier rápida (*Fast Fourier Transform* o *FFT*). El interferograma es una representación de la intensidad respecto al movimiento del espejo. Tras la aplicación de la transformada de Fourier y la apodización y corrección de fase de los datos, se obtiene un único espectro de la muestra, que dividido por el fondo (un espectro tomado en ausencia de muestra), da lugar a una representación de intensidad vs frecuencia (expresada en cm^{-1}).

El desarrollo del interferómetro de Michelson junto con la aplicación del algoritmo de la transformada de Fourier, introdujeron importantes mejoras en la relación señal/ruido respecto a los anteriores espectrofotómetros de infrarrojo basados en la dispersión, con lo

que se pudo empezar a abordar una correcta eliminación de la contribución del agua. También permitió el desarrollo de técnicas matemáticas que aumentan la resolución, no la resolución espectral, sino que producen un estrechamiento de la anchura de las bandas presentes, revelando bandas adyacentes que pudieran estar solapadas. El problema de la anchura y solapamiento de las bandas es un problema inherente en la espectroscopia de infrarrojo, producido principalmente por las heterogeneidades presentes en las estructuras sujetas a análisis y en el medio, además, de por una limitada resolución instrumental. Existen varios procedimientos de aumento de la resolución: derivada, deconvolución (*Fourier self-deconvolution*) e incremento de estructura fina (*Fine-structure enhancement*), siendo los procedimientos más utilizados la derivada y la deconvolución (Cameron *et al.*, 1987, Mantsch *et al.*, 1986, Cameron *et al.*, 1985).

Simetría	Descripción		Frecuencia aproximada (cm ⁻¹)	Descripción
En el plano	Amida	A	3300	NHs (100%)
		B	3100	
		I	1650	COs (80%), CNs, CCNd
		II	1550	NHib(60%), CNs (40%), COib, CCs, NCs
		III	1300	CNs (40%), NHib (30%), CCs' (20%), COib
Fuera del plano	Amida	IV	625	COd (40%), CCs'(30%), CNCd
		V	725	NHob, CNt
		VI	600	COob, CNt
		VII	200	NHob, CNt, COob

Tabla 1. Resumen de las bandas amida asociadas al enlace peptídico, basado en el espectro de la N-metil-acetamida (*s*, tensión; *d*, deformación; *t*, torsión; *ib*, flexión en el plano; *ob*, flexión fuera del plano; *s'*, tensión metilo-C). (Arrondo *et al.*, 1993).

El grupo funcional más característico de las proteínas es el grupo amida que forma el enlace peptídico. Se ha establecido que el espectro infrarrojo de proteínas está formado por las denominadas bandas amida provocadas por diferentes tipos complejos de vibración del grupo amida del enlace peptídico (Tabla 1) (Arrondo and Goni, 1999, Surewicz *et al.*, 1993).

Las bandas amida más estudiadas y utilizadas para determinar las cualidades estructurales de péptidos y proteínas son la Amida I y la Amida II, usándose sobre todo la Amida I debido a su mayor intensidad, mayor sensibilidad conformacional y menor contribución de las cadenas laterales. Los modos vibracionales de la Amida I se originan de la vibración de tensión del grupo C=O de la amida (acoplado a la vibración de flexión del N-H y flexión del enlace C-N) que da lugar a una banda en la región 1600-1700 cm^{-1} . La capacidad de formación de puentes de hidrógeno de estos grupos y la formación de dipolos transitorios, hacen que la banda Amida I sea sensible a la conformación de las proteínas. El acoplamiento de los dipolos transitorios provoca la división de la banda Amida I, y dicho acoplamiento depende de la orientación y la distancia de los dipolos implicados, por lo que permite obtener información acerca de la disposición espacial de los grupos peptídicos de un polipéptido. Cada componente de estructura secundaria contribuye por separado al espectro de infrarrojo, por lo que la banda Amida I va a ser una suma de todas las bandas que la componen (Surewicz et al., 1993). La principal dificultad en el análisis estructural de las bandas componentes radica en que usualmente la anchura de cada banda es mayor que la distancia que separa su máximo de frecuencia. Esto, como se comentaba anteriormente, se puede resolver mediante técnicas matemáticas, como por ejemplo la derivada y la deconvolución, que reducen la anchura de cada banda componente. La Tabla 2 resume la correlación entre la estructura secundaria de las proteínas con las frecuencias de la banda Amida I. La mayoría de las frecuencias de dicha banda disminuyen aproximadamente 10 cm^{-1} durante el intercambio H(hidrógeno)/D(deuterio). Los modos Amida I en D_2O son referidos como Amida I' y, en principio, las bandas Amida I y Amida I' poseen la misma información estructural.

La asignación de las bandas se basa en cálculos teóricos (Krimm and Bandekar, 1986, Torii and Tasumi, 1992), medidas empíricas de homopéptidos sintéticos (Lee and Chapman, 1986) y en estructuras tridimensionales de proteínas conocidas por otros métodos, principalmente rayos X.

Estructura Secundaria	Frecuencia de la Amida I o I' (cm⁻¹)
Hélice α	1648-1660
Hélice 3_{10}	1660-1668
Estructuras no ordenadas	1640-1648
Giros β	1660-1685
Hoja β intramolecular	1680-1690 1630-1640
Hoja β intermolecular	1670-1695 1610-1625

Tabla 2. Asignación de frecuencias (cm⁻¹) de componentes de la banda Amida I o I' a diferentes motivos de estructura secundaria de proteínas.

El procedimiento utilizado en esta Tesis para cuantificar las diferentes estructuras secundarias de los péptidos se basó en el método desarrollado por Byler y Susi (Byler and Susi, 1986), refinado por Arrondo et al. (Arrondo et al., 1993), para aplicar directamente sobre la banda Amida I'. Primero se estima el número y la posición de las bandas componentes de la Amida I', así como la anchura y la altura. Segundo, estos parámetros se utilizan en un proceso iterativo de mínimos cuadrados mediante el que se obtiene una combinación de bandas que reproducen el perfil de la Amida I' obtenida experimentalmente. Tercero, el área íntegra de cada banda se calcula como porcentaje respecto al área total de la Amida I'. Este procedimiento conlleva, al menos, tres suposiciones. Primero, se requieren varios parámetros iniciales en el proceso de ajuste. Esto puede realizarse con bastante fiabilidad si la relación señal/ruido del espectro es buena. Segundo, cada una de las bandas se asigna a un elemento estructural lo que en algunos casos no es inmediato, bien por la sensibilidad limitada de la Amida I' o por posibles interferencias de las cadenas laterales (Venyaminov and Kalnin, 1990). Tercero, se supone que la absorbancia molar de infrarrojo es la misma en todos los grupos peptídicos de la proteína, los cuales están implicados en diferentes elementos estructurales. Esta suposición es difícil de comprobar o rechazar, ya que no es posible obtener proteínas con estructuras secundarias completamente puras.

En el caso de los fosfolípidos, cabe diferenciar entre los modos vibracionales de las cadenas acíclicas, los de la región interfacial y los modos vibracionales de las cabezas polares (Mantsch and McElhaney, 1991, Arrondo *et al.*, 1993). Los principales modos vibracionales de las cadenas acíclicas se deben a las vibraciones del enlace carbono-

hidrógeno (CH_3 , CH_2 y $=\text{C-H}$). La vibración de tensión de los grupos metileno da lugar a una banda compuesta por dos bandas, uno centrado a $\sim 2929 \text{ cm}^{-1}$ que corresponde a la vibración de tensión anti-simétrica del CH_2 , y otro centrado a $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión simétrica del CH_2 . La frecuencia de estas bandas es sensible a la proporción de isómeros *trans/gauche* de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, y puesto que dicha relación aumenta con la transición de fase gel a líquido cristalino, la frecuencia de esta banda será sensible a la fase del fosfolípido, pudiendo utilizarse para observar dicha transición. Las bandas de tensión de los grupos CH_3 aparecen como pequeños hombros en la banda de tensión de los grupos CH_2 centrados a $\sim 2956 \text{ cm}^{-1}$ (anti-simétrico) y $\sim 2870 \text{ cm}^{-1}$ (simétrico). La región más ampliamente utilizada para el estudio de la interfase glicerol-cadena hidrocarbonada es la banda de tensión del grupo carbonilo. Dicha banda aparece entre 1700 y 1750 cm^{-1} . Esta banda es sensible a la polaridad y a la formación de puentes de hidrógeno. La banda de vibración de tensión del grupo CO esta formada por dos componentes centrados a 1742 cm^{-1} y 1728 cm^{-1} . El primero corresponde a aquellos grupos carbonilo que no se encuentran formando puentes de hidrogeno. La frecuencia de estos componentes no suele variar al alterar el microambiente de esta región, pero sí varía su intensidad, lo que va a provocar variaciones de la frecuencia de la banda global.

3. Dicroísmo circular

La teoría de dicroísmo circular (CD) fue desarrollada por Biot y Fresnel (revisión de (Neumann and Snatzke, 1990)). Un haz de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfase y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo y la distorsión de este plano genera una elipse (Figura 2).

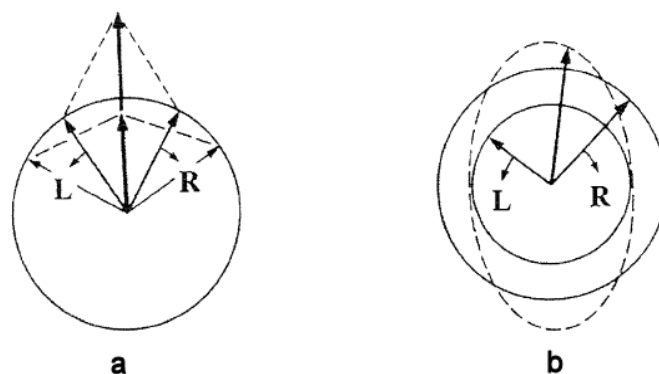


Figura 2. Diagrama donde se muestra las formas de combinación de la luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda: (a) si las dos ondas tienen la misma amplitud, el resultado es la luz polarizada según un plano; y (b) si sus amplitudes difieren, el resultado es la luz elípticamente polarizada.

Los cromóforos de interés en las cadenas polipeptídicas son sus enlaces peptídicos. Estos absorben por debajo de los 240 nm debido a transiciones electrónicas de carácter $n\pi^*$ a 220 nm y $\pi\pi^*$ a 190 nm, las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos, con transiciones $\pi\pi^*$, absorbiendo principalmente en el rango de 260 a 320 nm y los puentes disulfuro que presentan una banda débil y ancha en torno a 260nm por transiciones $n\sigma^*$. A partir de los datos que se extraen de estos cromóforos por CD se puede obtener información sobre la estructura secundaria y terciaria de las proteínas (Woody, 1995, Kelly *et al.*, 2005). Mediante CD en el ultravioleta lejano (180-260 nm), se pueden observar espectros definidos para cada estructura secundaria (Figura 3). El espectro típico de hélice α presenta dos bandas negativas a 222 nm y 208 nm y una positiva en torno a 190 nm. El espectro para una lámina β es menos intenso, presentando dos bandas negativas, una sobre 217 nm y otra a 180 nm, y una banda positiva en torno a 195 nm. Se ha visto que hay más variedad en estos espectros para modelos de estructuras en láminas β que para modelos en hélice α , lo que se atribuye a que las láminas β pueden ser paralelas, antiparalelas o mixtas, intra o intermoleculares, y con diferentes extensiones. Los giros pueden adquirir conformaciones distintas (giros de tipo I, II y III) por lo que no hay un espectro típico de CD característico para este tipo de estructura. En estructuras desordenadas el espectro típico presenta sólo una banda negativa cerca de 200 nm, sin embargo, se ha visto que para péptidos como poli(Lys), poli(Glu) y poli(ProL), presentan una banda positiva alrededor de 220 nm; si esta banda es negativa indica que el péptido presenta algún tipo de conformación local, que puede ser tanto hélice α como lámina β .

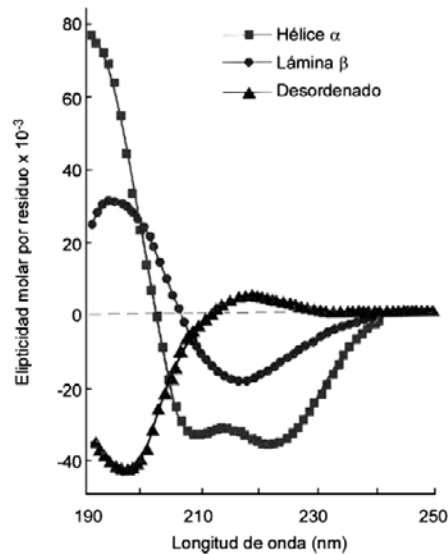


Figura 3. Espectros de CD en ultravioleta lejano asociado con varios tipos de estructura secundaria. Cuadrados, hélice α ; círculos, hoja β anti-paralela; triángulos, estructura desordenada.

4. Ensayos de agregación de liposomas

Las vesículas en suspensión se mantienen separadas unas de las otras debido a que existen una serie de fuerzas que impiden su agregación. Las cuatro fuerzas que intervienen en la adhesión de los liposomas son: fuerzas de hidratación, fuerzas electrostáticas, interacciones estéricas y fuerzas de van der Waals (Ito et al., 1989). Las tres primeras son generalmente de carácter repulsivo, mientras que la cuarta es atractiva. En la mayoría de los casos las fuerzas repulsivas se imponen a las de van der Waals, y por tanto los liposomas no se agregan. En general, las interacciones estéricas no suponen una contribución significativa a no ser que en la composición de la vesícula exista algún tipo de lípido con un grupo polar voluminoso. Por tanto, las fuerzas de hidratación y las electrostáticas son las que predominan. Las primeras prevalecen cuando las vesículas están compuestas por lípidos zwitteriónicos, y las segundas en liposomas con carga eléctrica neta. Cuando por efecto de una proteína o cualquier otra molécula se reducen las fuerzas de repulsión, las fuerzas de van der Waals cobran importancia y las vesículas pueden llegar a agregarse.

Para medir agregación de liposomas se pueden medir los cambios de intensidad de luz dispersada por los liposomas. Para ello, se mide la dispersión de la luz a 90° en un fluorímetro (nefelometría) o se mide la turbidez en un espectrofotómetro de absorción. La turbidimetría de liposomas con un radio inferior a 100 nm se pueden explicar por la teoría de Rayleigh-Gauss-Debye, asumiendo que las vesículas son esferas óptimamente homogéneas con índices refractivos determinados por el volumen del lípido en la vesícula (Matsuzaki et al., 2000). Los ensayos de agregación de liposomas realizados en esta Tesis se basan en experimentos de turbidimetría, observándose la densidad óptica (DO) a 405 nm.

5. Fluorescencia

La luminiscencia es la emisión de la luz de alguna molécula y ocurre desde estados electrónicamente excitados. La luminiscencia se divide formalmente en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado. En este apartado nos referiremos al fenómeno de fluorescencia. Su estudio proporciona una valiosa información sobre aspectos estructurales de la molécula responsable, o de su relación con el ambiente que la rodea.

En algunas moléculas como consecuencia de la absorción de un fotón, un electrón pasa desde el estado fundamental al estado excitado. Dicha transición debe cumplir una serie de reglas de selección deducidas de la mecánica cuántica ondulatoria. Una vez en el estado excitado el electrón tiende a pasar al estado fundamental. Este retorno se puede llevar a cabo de múltiples formas, las cuales compiten entre sí. Puede ocurrir de una forma no radiativa (sin emitir radiación electromagnética) o radiativa (emitiendo un fotón); a estas últimas se les conoce con el nombre de luminiscentes. Los procesos de emisión fluorescente son procesos de relajación radiativos en los que el electrón “cae” desde el modo vibracional de menor energía del estado excitado a uno de los modos vibracionales del estado fundamental mediante la emisión de un fotón de luz. El retorno del modo vibracional excitado puede dar lugar a distintos modos vibracionales del estado fundamental. Como consecuencia, aunque todas las moléculas se exciten a la misma longitud de onda, los fotones emitidos pueden tener distintas longitudes de onda de

emisión, originando el espectro de emisión fluorescente. La emisión de fluorescencia a una única longitud de onda, excitando a diferentes valores de longitud de onda permite obtener el espectro de excitación. En muchos casos el espectro de emisión es la imagen especular del de absorción, pero desplazado hacia el rojo, además, si una molécula posee un único fluoróforo el espectro de excitación debería coincidir con el espectro de absorción. Para que una molécula pueda emitir fluorescencia es necesario que sea capaz de absorber luz y, por tanto, poseer cromóforos, es decir, enlaces o conjuntos de enlaces responsables de dicha absorción de la luz.

Los fluoróforos se pueden dividir en *intrínsecos* y *extrínsecos* según formen parte natural de la muestra o se añadan artificialmente para conferirle las propiedades fluorescentes deseadas. Los fluoróforos presentes en las proteínas son los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina). En el caso de las membranas lipídicas, éstas no presentan fluorescencia natural, por lo que para el estudio de las propiedades de la bicapa es necesario utilizar sondas fluorescentes que se inserten en ella. A continuación se mostrarán una serie de técnicas fluorescentes utilizadas en esta Tesis Doctoral.

5.1. Cálculo del coeficiente de partición de péptidos en membrana mediante espectroscopia de fluorescencia

La información que podemos obtener de la emisión de fluorescencia de una molécula es muy variada. Según la Ley de Stokes, el fotón emitido por fluorescencia tiene siempre menor energía que el fotón absorbido, dando lugar a que la frecuencia de la luz emitida por los fluoróforos sea siempre menor que la de la radiación incidente, es decir, que esté desplazada hacia el rojo con respecto a ella. En el caso de los fluoróforos polares este desplazamiento de Stokes va a ser mucho mayor en presencia de un disolvente polar, debido a interacciones entre el fluoróforo excitado y su entorno. Este es el caso, por ejemplo del triptófano. Esta propiedad de los fluoróforos polares nos va a dar información sobre el microambiente en el que se encuentren situados, ya que, por ejemplo, en el caso del triptófano, el desplazamiento hacia el rojo de la radiación emitida será mucho mayor en un disolvente polar que en uno apolar, por lo que se podrá utilizar la longitud de onda de la luz emitida como parámetro para la monitorización de la desnaturalización de una proteína

(en el caso de que el Trp se encuentre aislado del medio en el interior de la proteína). Por otra parte, también se puede monitorizar el cambio del máximo de la longitud de onda hacia el azul de la radiación emitida, conjuntamente con el aumento de la intensidad de la fluorescencia de los triptófanos, cuando el triptófano de la proteína pasa de un medio acuoso a un medio más apolar, como puede ser una membrana lipídica.

El coeficiente de partición (K_p) de un péptido en una membrana se puede definir como la relación entre la cantidad de péptido que hay unido a la membrana con respecto a la cantidad de péptido que hay libre en el tampón. Se pueden utilizar diversas metodologías de espectroscopía para el cálculo del K_p de una molécula fluorescente entre la fase lipídica y la acuosa (Santos et al., 2003). Para obtener los valores de K_p mostrados en esta Tesis se ha utilizado la intensidad de fluorescencia del o los triptófano(s) del péptido en un medio polar (tampón acuoso) y en presencia de distintas concentraciones de vesículas. También se ha utilizado la tirosina como fluoróforo, aunque en este caso no es posible detectar un desplazamiento en el máximo de onda (Lakowicz, 1999), si que se puede observar el aumento de intensidad de fluorescencia en presencia de un medio apolar como la membrana.

5.2. Ensayos de atenuación de fluorescencia

La atenuación (*quenching*) de la fluorescencia es otro parámetro de utilidad a la hora de caracterizar un sistema estudiado. Según el mecanismo de acción del atenuador (*quencher*) se distinguen dos tipos de atenuación. La atenuación colisional o dinámica, es aquella en la que el atenuador devuelve al fluoróforo a su estado fundamental mediante un proceso de difusión. Si el fluoróforo se encuentra en el estado excitado, pasa al estado fundamental sin emitir radiación, al disiparse la energía en forma de energía cinética de la molécula de atenuador. La eficacia de este proceso depende de la probabilidad estadística de que se produzca un encuentro entre un par fluoróforo-atenuador. Durante el proceso ninguna de las dos moléculas sufre cambios en su estructura. El otro tipo de atenuación se denomina estática, donde el atenuador puede asociarse al fluoróforo, incluso aunque éste se encuentre en el estado fundamental, formando un complejo permanente en equilibrio químico con las especies separadas, de tal manera que el fluoróforo se puede encontrar

libre o asociado. Si se excita un fluoróforo en su estado libre, la emisión de fluorescencia tendrá lugar según su rendimiento cuántico. Pero, si la que se excita es una molécula de fluoróforo asociada a su atenuador, dicha molécula pasará al estado fundamental sin emitir radiación. Tanto en el caso de la atenuación colisional o dinámica como en el de la estática, la pérdida de intensidad de emisión fluorescente dependerá de la concentración de atenuador que haya en el medio.

Existen multitud de atenuadores que van a mostrar diferentes preferencias por entornos distintos. Esta característica de los atenuadores puede ser utilizada para determinar la accesibilidad al solvente de un fluoróforo, así como su localización dentro de una proteína, bicapa, etc. En la Tesis presentada, para estudiar la localización del o los triptófanos del péptido en la membrana, se realizaron experimentos de atenuación de la fluorescencia del Trp mediante atenuadores lipofílicos asociadas a membrana, sondas 5NS y 16NS. Estas moléculas de ácido esteárico están derivatizadas con grupos doxiles (atenuadores) en la cadena hidrocarbonada, específicamente en los carbonos 5 (5NS) y 16 (16NS). Estas moléculas se utilizan para determinar la profundidad del fluoróforo, por ejemplo, el triptófano de un péptido tras insertarse en la membrana. El 5NS es un atenuador más eficaz para moléculas que se sitúan en la interfaz de la membrana o cerca de ella, mientras que el 16NS atenúa mejor las moléculas que se sitúan en la profundidad de la membrana (Fernandes and de la Torre, 2002).

Para estudiar la exposición de los triptófanos del péptido al disolvente cuando éste está interaccionando con la membrana, se realizaron experimentos de atenuación con acrilamida. La acrilamida es una molécula soluble que tiene la capacidad de atenuar la fluorescencia de residuos fluorescentes de péptidos o proteínas. Se utiliza normalmente en estudios de proteínas, para determinar cuanto de expuesto(s) está(n) el o los residuos fluorescentes de una proteína en distintas condiciones (Eftink and Ghiron, 1976). En nuestro caso la finalidad de la acrilamida es la misma, pero en sistemas membrana-péptido.

5.3. Ensayos de transferencia de energía (FRET)

Además de los fenómenos de desexcitación de un fluoróforo en su estado excitado, existe otro muy común. Ocurre como consecuencia de la transferencia de energía de excitación desde el fluoróforo a una molécula vecina, provocando en ella otra excitación. Es decir, se produce una transferencia de la excitación desde el fluoróforo (donador, D) a otra molécula que actúa como aceptor (A). Esta transición se produce, en primera instancia, como consecuencia de una interacción dipolo-dipolo entre el donador y aceptor, disminuyendo el tiempo de vida natural del estado excitado y compitiendo con otras formas de desexcitación. Esta transferencia de energía se produce sin que medie emisión de un fotón por el donador. Influyen diversos factores para la eficacia del proceso: (1) es necesario que el espectro de la emisión del donador tenga un elevado grado de solapamiento con el espectro de absorción del aceptor. Cuanto mayor sea este solapamiento, mayor será la probabilidad de transferencia de la excitación; (2) dependerá de las intensidades de los espectros de emisión del donador y de absorción del aceptor, que estarán a su vez relacionados con el rendimiento cuántico de fluorescencia del donador y con el coeficiente de extinción molar del aceptor en la zona del solapamiento de los espectros; (3) la distancia entre el aceptor y el donador también es decisiva, lo que hace que esta técnica sea extremadamente sensible a cambios en la distancia entre el donador y el aceptor. La probabilidad de transferencia decrece con la sexta potencia de la distancia entre ambos; (4) la orientación relativa de los dipolos transitorios de las moléculas de aceptor y donador es, también, fundamental en el proceso de transferencia. En principio, salvo que ambos dipolos sean perpendiculares, la probabilidad de la transferencia siempre es distinta de cero.

5.3.1. Ensayos de mezcla de lípidos (hemifusión y fusión)

La mezcla de lípidos es un proceso generalmente mediado por un agente externo por el que los lípidos de diferentes vesículas se mezclan debido a la ruptura de la capa de hidratación de los liposomas. Para estudiar el fenómeno se utilizó la metodología de Struck et al. (Struck et al., 1981), que está basada en la transferencia de energía entre un par donador-aceptor. Se utilizaron dos derivados fluorescentes de la fosfatidiletanolamina

(PE): la N-[7-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol-4-1] fosfatidiletanolamina (NBD-PE) y la N-(lisamina-rodamina B-sulfonil) fosfatidiletanolamina (RhB-PE), donador y aceptor, respectivamente. Las dos sondas fluorescentes están unidas al grupo amino libre del grupo polar de la PE, de tal forma que se puede incorporar con facilidad a los liposomas. Este par donador-aceptor se incorporan en la membrana de una misma población de liposomas, los cuales se mezclan con liposomas libres de ambas sondas, en una relación 1:4. Si hay hemifusión o fusión se producirá una dilución del par donador-aceptor, lo cual producirá un alejamiento entre ambas sondas, que a su vez producirá una disminución en la transferencia de energía entre ambas sondas. En el ensayo de hemifusión no se puede discriminar la mezcla de lípidos de la hemicapa externa (hemifusión) de la mezcla de lípidos de la hemicapa interna (fusión). Sin embargo, en el ensayo de fusión se añade exógenamente ditionito sódico para reducir el NBD-PE y eliminar la fluorescencia de la sonda de la hemicapa externa solamente. Por lo tanto, si se observara transferencia de energía se debería a la mezcla de lípidos de la hemicapa interna de liposomas diferentes, por lo que podríamos decir que está ocurriendo un proceso de fusión.

5.4. Anisotropía con sondas extrínsecas

Otra característica de los fluoróforos es que pueden ser excitados fotoselectivamente, dado que las moléculas fluorescentes absorben preferentemente los fotones cuyo vector eléctrico es paralelo al momento de transición de su dipolo. Si se excita una población de fluoróforos con luz polarizada, se excitará selectivamente a aquellos fluoróforos que estén orientados con su momento de transición paralelo al vector eléctrico de la excitación. Del mismo modo, la emisión tendrá lugar en forma de luz polarizada a lo largo de un eje fijo en el fluoróforo. La velocidad con la que un fluoróforo es capaz de rotar durante su tiempo de vida en el estado excitado determinará su polarización o anisotropía. Esta característica de los fluoróforos se ha utilizado ampliamente para determinar el volumen de las proteínas (puesto que está relacionado directamente con el tiempo de correlación rotacional), y la viscosidad o fluidez del interior de las bicapas lipídicas.

Para estudiar los cambios en el orden de la membrana a distintas profundidades, se realizaron experimentos de polarización de fluorescencia en estado estacionario con las siguientes sondas: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), y dos derivadas de ella: 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH) y ácido propiónico 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (PA-DPH). El DPH presenta ciertas propiedades que permiten su localización en la profundidad de la membrana lipídica: (1) se trata de una molécula altamente hidrofóbica, por lo que se espera que se sitúe en la profundidad de la membrana; (2) es una molécula con una longitud aproximada de 14 Å; (3) su estructura en forma de varilla permite que el DPH se empaquete bien entre las cadenas acíclicas de los fosfolípidos (Florine-Casteel and Feigenson, 1988). El uso de derivados del DPH también ayuda a localizar la molécula de DPH a distintas profundidades dentro de la membrana. En esta Tesis se han utilizado dos derivados del DPH: TMA-DPH y PA-DPH. Las profundidades a las que quedan los grupos unidos a la molécula de DPH desde el centro de la membrana son las siguientes: TMA-DPH \rightarrow 19 Å, PA-DPH \rightarrow 15-16 Å y DPH \rightarrow 8-11 Å (Garbino et al., 2006).

5.5. Estudios del potencial electrostático en la superficie de la membrana

Existen tres tipos principales de potenciales electrostáticos asociados a las membranas: el potencial electrostático de superficie (Ψ_s), el potencial dipolar (Φ_d) y el potencial transmembrana ($\Delta\Psi$) (Figura 4).

En la presente tesis utilizamos estudios del potencial dipolar de membrana. El potencial dipolar de membrana (Φ_d) tiene su origen en la polarizaciones moleculares, asociadas con el grupo carbonilo ($C^{\delta+}=O^{\delta-}$) y los componentes del fosfato unidos al oxígeno ($O^{\delta-}-P^{\delta+}$) de los fosfolípidos en la membrana. Estas polarizaciones ocurren entre la superficie de membrana y la interfase hidrofóbica de la membrana. Además, moléculas individuales de agua adoptan una estructura organizada a lo largo de la superficie de la membrana, contribuyendo de esta manera como dipolos moleculares permanentes (Brockman, 1994). Se piensa que los grupos dipolares se organizan de tal forma que el interior de la membrana es positivo con respecto a la fase acuosa externa, teniendo una magnitud de varios cientos de milivoltios. Dependiendo de la estructura del lípido, esta

magnitud puede variar de 100 a más de 400 mV, positivo en el interior de la membrana (Schamberger and Clarke, 2002) (Figura 4). El potencial del dipolo ocupa las regiones cercanas a la superficie de la membrana.

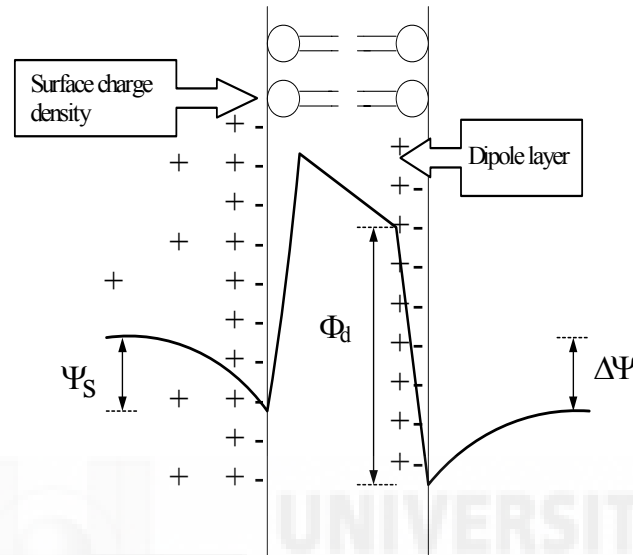


Figure 4. Potenciales electrostáticos de la membrana. Perfil energético de la interacción de una carga positiva de prueba con los campos electrostáticos que podría encontrarse en una bicapa lipídica. La densidad de carga superficial, σ , debida a la presencia de proteínas o lípidos con carga, produce un potencial electrostático en la superficie de la membrana (Ψ_s). La capa de dipolo de la membrana da lugar a un gran potencial dipolar interno (Φ_d), que alcanza un valor de aproximadamente 250 mV en bicapas de PC. El potencial dipolar es el responsable de que el núcleo hidrocarbonado de la bicapa sea positivo respecto a la fase acuosa. Cuando se producen separaciones de carga entre ambos lados de la bicapa se forma un potencial electrostático transmembranal ($\Delta\Psi$). Por claridad, las cargas y dipolos sólo se muestran en un lado de la bicapa. (Clarke and Kane, 1997, Gross *et al.*, 1994).

En 1979, Loew et al. introdujeron la sonda fluorescente potenciométrica 1-(3-sulfonatopropyl)-4-[b[2-(di-*n*-octylamino)-6-naphthyl]vinyl] pyridinium betaina, conocida como Di-8-ANEPPS (Loew et al., 1979). Las propiedades fluorescentes de la molécula di-8-ANEPPS dependen en gran parte de su ambiente, siendo no fluorescente cuando se encuentra en solución acuosa (Fluhler et al., 1985). Esta sonda se utiliza para medidas del potencial del dipolo de la membrana usando un método fluorescente que relaciona dos longitudes de onda (*dual-wavelength ratiometric fluorescence method*) (Clarke and Kane, 1997, Gross *et al.*, 1994, Montana *et al.*, 1989, Cladera *et al.*, 1999, Cladera and O'Shea, 1998). Di-8-ANEPPS permite medir la variación en la magnitud del potencial dipolo y

monitorizar la interacciones moléculas-membrana (Cladera and O'Shea, 1998). También puede usarse como indicador de la inserción de macromoléculas dentro de la membrana; ya que la macromolécula podría aumentar o disminuir el potencial del dipolo de la membrana, dependiendo de su carga y orientación en su inserción.

5.6. Fluorescencia resuelta en el tiempo

Todas las técnicas fluorescentes descritas anteriormente se basan en la fluorescencia en estado estacionario, pero el uso de la fluorescencia resuelta en el tiempo puede ser muy útil en la identificación de acontecimientos inter o intramoleculares que se desarrollan durante el tiempo de vida del fluoróforo en su estado excitado.

Una vez que una muestra con un fluoróforo, por ejemplo un triptófano, se excita por un pulso de luz infinitamente fino en el dominio temporal, la intensidad de fluorescencia de la muestra, $I(t)$, en las situaciones más simples, está descrita por decaimientos monoexponenciales definidos por la siguiente ecuación, $I(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$ donde I_0 es la intensidad de fluorescencia inicial y τ el tiempo de vida de fluorescencia, definido como el tiempo necesario para que la intensidad de fluorescencia decrezca 1/e de su valor inicial (Lakowicz, 1999). Sin embargo, la mayoría de las moléculas tienen un decaimiento de la fluorescencia mucho más complejo, y no pueden ser descritas solamente por una exponencial. En este caso el decaimiento está definido por la suma de dos o más exponenciales, $I(t) = I_0 \sum a_i \exp(-t/\tau_i)$ donde τ_i es el tiempo de decaimiento y a_i representa la amplitud de los componentes a un tiempo cero. En la mayoría de los análisis del decaimiento de la intensidad de la fluorescencia, la intensidad total no se mide, y la $\sum a_i$ se normaliza a la unidad. La aplicación más obvia de esta ecuación es a una mezcla de fluoróforos, cada uno de los cuales tiene un tiempo de decaimiento. En una proteína el tiempo de decaimiento se asigna a cada residuo de Trp, aunque en general esto no es posible. El modelo del análisis de las multiexponenciales del decaimiento de la fluorescencia es quizás el modelo más poderoso debido a que casi cualquier decaimiento, independientemente de su complejidad puede ser ajustado con la ecuación antes descrita.

Cuando se usa la ley de los decaimientos multiexponenciales normalmente se determina también el tiempo de vida promedio de la fluorescencia, $\langle \tau \rangle$, que está definido por, $\langle \tau \rangle = (\sum_i a_i \tau_i^2 / \sum_i a_i)$ o como el rendimiento cuántico de la vida media de fluorescencia, $\bar{\tau}$ (Lakowicz, 1999), $\bar{\tau} = \sum_i a_i \tau_i$.

6. Estudios con monocapas: inserción en monocapas e isothermas de compresión

Además de los estudios con bicapas en forma de liposomas, como se describe en el apartado 1 de este capítulo, es muy útil el uso de otro tipo de modelo de membranas, que son las películas de monocapas. Este tipo de monocapas que se colocan en disoluciones acuosas se denominan monocapas de Langmuir (Langmuir, 1917). En interfases aire-agua las moléculas anfífilas se orientan de forma que las partes hidrofóbicas queden expuestas hacia el aire y las regiones hidrofílicas hacia la fase acuosa. Las monocapas son un excelente modelo para el estudio del ordenamiento en dos dimensiones, con dos variables termodinámicas controladas, temperatura y presión (Kaganer *et al.*, 1999, Brockman, 1999). El interés del uso de monocapas de fosfolípidos como membranas modelo consiste también en su homogeneidad, su estabilidad y su geometría plana, donde las moléculas de lípido tienen una orientación específica (Maget-Dana, 1999). Las monocapas son también un adecuado modelo de estudio en condiciones cercanas a las biológicas, lo que ocurre cuando un péptido hidrosoluble, presente en el medio extracelular, llega a la superficie de la membrana de la célula diana.

6.1. Inserción en monocapas

El término “inserción en monocapas” se usa para describir la interacción de una monocapa insoluble extendida en la interfase agua/aire con un compuesto soluble activo presente en la fase acuosa. La interacción se puede medir de dos formas. La presión de la película puede mantenerse constante y se observa el incremento del área de la película. El segundo método y el más utilizado, consiste en mantener el área de la película constante y

medir el cambio de la presión de la superficie al añadir el compuesto que se inserta en la subfase. El dispositivo experimental consiste en un pequeño pocillo a través del cual se inyecta el péptido en disolución (Figura 5). Las monocapas de lípido se forman a la presión requerida extendiendo la disolución de lípido. Los parámetros que se deben tener en cuenta son: (1) la presión inicial de la película de lípido, π_0 , que refleja el empaquetamiento de los lípidos en la monocapa; (2) la concentración de péptido, C , en la subfase; (3) el cambio máximo de presión de lípido tras la interacción del péptido disuelto en la subfase, $\Delta\pi$; (4) la presión del lípido a la cual el péptido no se inserta más en la monocapa, π_c .

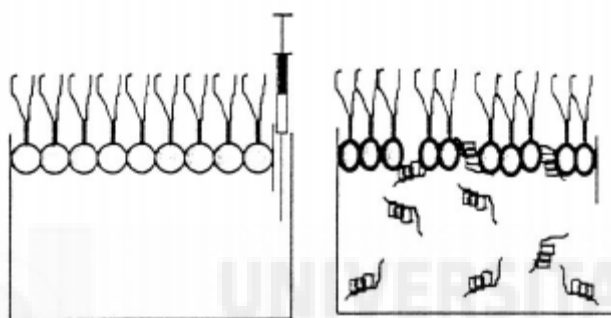


Figura 5. Representación esquemática de un experimento de inserción: inyección de una disolución de péptido bajo la monocapa de lípido (izquierda) y inserción de las moléculas de péptido en la monocapa de lípido (derecha).

6.2. Isotermas de compresión

Las medidas de isotermas de presión de superficie-área (π -A) nos proporcionan información de las interacciones intermoleculares que no son accesibles directamente de las bicapas. Además, las isotermas π -A y compresibilidad nos dan indicadores precisos de los cambios en la estructura de la monocapa. Lípidos de diferentes tipos de cadenas acílicas y diferentes cabezas polares ocupan diferentes áreas. Estas áreas pueden ser determinadas por las isotermas π -A donde la presión de colapso particular representa un punto en el cual las moléculas están empaquetadas en su máxima densidad. El área mínima de la superficie de un fosfolípido disaturado, DMPC por ejemplo, está en torno a 45 \AA^2 y para un lípido insaturado, tal como el POPC, está próximo a 60 \AA^2 . Las discontinuidades en la isotermas presión/área indican transiciones de fase (Brezesinski and Mohwald, 2003) (Figura 6). La monocapa más diluida, con un área de cientos de \AA^2 /molécula, se describe como un gas bidimensional (G). Al incrementar la presión, i.e. bajando el area/molécula, la

monocapa entra en una fase líquido expandida (LE). Una mayor compresión de la monocapa resulta en la transición de LE a fase líquido condensada (LC) con un plato indicando una transición de primer orden. Finalmente, otra curva puede observarse si seguimos comprimiendo y que se refiere a la transición de LC a fase sólida (S).

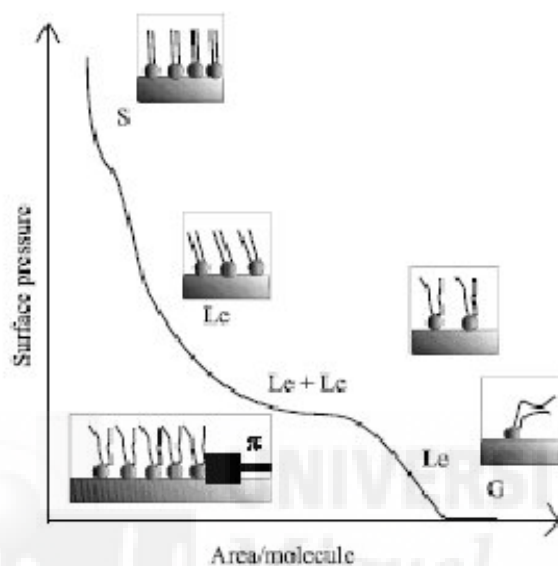


Figura 6. Monocapa de Langmuir depositada en la interfase aire-agua. Esquema ilustrativo de una isoterma presión-área con las respectivas fases explicadas en el texto indicadas.

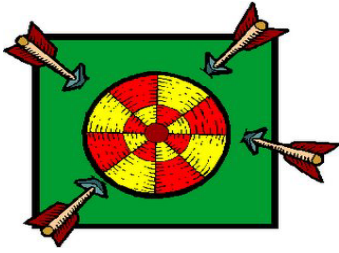
7. Resonancia magnética nuclear de ^{31}P

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las metodologías más versátiles disponibles hoy en día para el estudio de la estructura y dinámica molecular. Esta metodología es una espectroscopia de absorción en el intervalo de radiofrecuencias (10^6 - 10^{10} Hz), la cual permite estudiar las transiciones entre los distintos estados de espín de ciertos núcleos situados en campos magnéticos. Los primeros estudios sobre las biomembranas y los sistemas lipídicos utilizaban como núcleo el ^1H , mientras que posteriormente se han estudiado otros núcleos, como ^2H , ^{13}C , ^{31}P , etc. La utilización del núcleo ^{31}P a la metodología de RMN supuso un gran avance en el estudio de las diferentes fases que pueden adoptar los lípidos en disolución y por supuesto en su ambiente natural. Esta técnica permite la discriminación cuantitativa entre las fases

lipídicas más importantes encontradas hasta ahora, pudiendo ser aplicada tanto a sistemas modelos como a membranas biológicas.

El uso de ^{31}P RMN se basa en la gran anisotropía del desplazamiento químico que exhibe el fósforo de los fosfolípidos debido a la fase característica de los mismos. La anisotropía resultante origina entonces un espectro ancho característico, cuya forma y anchura dependen del movimiento del fosfolípido, el cual a su vez está relacionado con la fase lipídica. Pero, en el caso estudiado en la presente tesis, lo que se pretendía utilizar eran mezclas de diferentes lípidos con el fin de observar la especificidad de interacción del péptido de estudio con diferentes cabezas polares de fosfolípido, en ese caso los espectros de RMN consisten en distribuciones de intensidad solapadas del mismo tipo y de similares valores efectivos de anisotropía de desplazamiento químico, donde los componentes de lípidos individuales no pueden ser resueltos (Macdonald *et al.*, 1991, Marassi and Macdonald, 1991, Killian *et al.*, 1986, Mayer *et al.*, 1986, Pinheiro and Watts, 1994a).

Los constituyentes individuales de la membrana de fosfolípidos pueden ser observados de forma simultánea por ^{31}P MAS-RMN en alta resolución donde la rotación de la muestra se usa para promediar en parte o completamente la anisotropía de desplazamiento químico efectivo de los grupos fosfato de los lípidos. Con este método se pueden identificar interacciones específicas entre proteínas o péptidos y los componentes individuales de bicapas lipídicas mixtas, donde por ^{31}P MAS-RMN los fosfolípidos de la membrana pueden ser resueltos de acuerdo a sus desplazamientos químicos isotrópicos de ^{31}P (Pinheiro and Watts, 1994a, Pinheiro and Watts, 1994b).



Capítulo



Objetivos y presentación de trabajos



1. Objetivos y presentación de trabajos

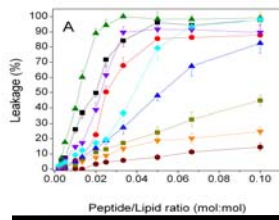
El objetivo general de esta Tesis Doctoral consistió en la búsqueda de las regiones membranotrópicas de la glicoproteína S del SARS-CoV y como objetivos particulares la caracterización biofísica de dichas regiones. Para ello se estudió la interacción y unión de los péptidos seleccionados con membranas modelo mediante espectroscopia de fluorescencia, su efecto en la desestabilización de la membrana y en la organización de la misma mediante sondas fluorescentes y espectroscopia de infrarrojo, su capacidad para promover la fusión y la agregación y los cambios estructurales inducidos en los diferentes fragmentos estudiados como consecuencia de la interacción con la membrana. Los ensayos se realizaron con diversas composiciones lipídicas para evaluar el papel que juegan diferentes lípidos en el proceso de fusión y la dependencia por determinados lípidos que pudieran tener los péptidos caracterizados.

La consecución de los objetivos anteriormente descritos se llevo a cabo en las siguientes publicaciones científicas seleccionadas para formar parte de la presente Tesis Doctoral:

- P-I. Guillén J., Pérez-Berná A. J., Moreno M.R. and Villalaín J. Identification of the membrane-active regions of the severe acute respiratory coronavirus spike membrane glycoprotein using a 16/18-mer peptide scan: implications for the fusion mechanism. 2005. *Journal of Virology*. **79(3)**, 1743-1752. Impact factor: 5.341.
- P-II. Guillén J., Moreno M.R., Pérez-Berná A. J., Bernabeu A. and Villalaín J. Interaction of a peptide from the pre-transmembrane domain of SARS-CoV spike protein with phospholipids membranes. 2007. *J Phys Chem B*. **111**, 13714-13725. Impact factor: 4.115.
- P-III. Guillén J., de Almeida R.F.M., Prieto M. and Villalaín J. Structural and dynamic characterization of the interaction of the putative fusion peptide of the S2 SARS-CoV virus protein with lipid membranes. 2008. *J Phys Chem B*. Accepted manuscript. Impact factor: 4.115.

El anexo 1 también se encuentra dentro de los objetivos de la tesis, aunque se añade en el anexo 1, ya que artículo se encuentra todavía en proceso de revisión.

- An-I. Guillén J., Pérez-Berná A. J., Moreno M.R. and Villalaín J. The internal membrane-active peptide from SARS-CoV S2 glycoprotein. Biophysical characterization and membrane interaction. Submitted to *Virology*. Impact factor: 3.525.



Capítulo

IV

Resultados y discusión



1. Identificación de las regiones membrano-activas de la glicoproteína S del SARS-CoV.

El primer capítulo de la presente tesis consistió en la búsqueda de regiones membranotrópicas o membrano-activas en la glicoproteína S del SARS-CoV. Para ello realizamos un análisis teórico de las secuencias, con representaciones mono y bidimensionales de los índices de hidrofobicidad, interfacialidad y momento hidrofóbico, así como estudios experimentales sobre membranas modelo de la secuencia completa de la glicoproteína S mediante el uso de librerías de péptidos. Esta librería de péptidos estaba compuesta por 169 péptidos de 16/18 aminoácidos de longitud (Publicación-I, Figura 1B) y la metodología empleada ha sido la liberación de un fluoróforo encapsulado, 5-carboxifluoresceína (CF).

En el dominio S1 los efectos mayores se observaron para los péptidos 34 y 85, que en la mezcla de EPC/SM/Chol (70:15:15) produjeron un porcentaje de liberación de contenidos de 33% y 22%, respectivamente, a la relación péptido/lípido más alta utilizada. Prácticamente se observó lo mismo en liposomas compuestos de EPC/CHOL (5:1) (P-I, Figuras 2A y 2B) observándose el mayor efecto para los péptidos 34 y 85. Ningún otro péptido del dominio S1 ejerció un efecto en la liberación de contenidos intraliposomal significativo. En el caso de membranas modelo con lípidos obtenidos de un extracto lipídico de neumocitos de tejido pulmonar (P-I, Figura 2C), se pudo observar que el porcentaje de liberación de contenidos se redujo respecto a los anteriores. Sin embargo se observaron patrones similares a los descritos anteriormente, ya que los péptidos 34 y 85 mostraron unos valores de liberación de contenidos relativamente altos comparados con los observados en los otros péptidos pertenecientes al dominio S1. Además se observó que para esta composición de liposomas, el péptido 50 también mostró un valor de liberación de contenidos similar. De igual forma que ocurre con las regiones internas de gp120 de VIH que interactúan con gp41 (York and Nunberg, 2004), las regiones de la subunidad S1 donde se localizan estos péptidos podrían asociarse con el dominio S2 por interacciones hidrofóbicas específicas antes de que la subunidad S1 misma interaccionara con sus receptores. Además, estas zonas hidrofóbicas podrían ser importantes no sólo para la unión proteína-proteína si no también para la interacción con la membrana, ya que S1 permanecería covalentemente unida al dominio S2 durante el proceso de fusión. De hecho,

en otros trabajos realizados en nuestro laboratorio (datos no publicados) hemos encontrado que varios péptidos derivados de la región gp120 de VIH que supuestamente se asocian con sus receptores tienen un efecto significativo en la liberación de contenidos de la membrana. Por ello, las regiones que contienen a los péptidos con mayores efectos en la liberación de contenidos, podrían ser candidatas a interactuar con el receptor o receptores celulares. De hecho los péptidos 34 y 50 estarían localizados dentro de la secuencia comprendida entre los aminoácidos 318-510 que se ha visto que es una región clave en la interacción con el receptor celular ACE2 (Wong et al., 2004).

En el caso del dominio S2 se pudo observar claramente que mientras la gran mayoría de péptidos no ejercieron ningún efecto en la liberación de contenidos, el péptido 162 mostró un gran efecto alcanzando casi un 100% de liberación en la mezcla EPC/SM/CHOL (70:15:15). Otros péptidos que tuvieron un efecto significativo, aunque no tan alto como el 162, fueron el péptido 163 y con algo menos de eficacia los péptidos 113, 123, 147 y 148 (P-I, Figura 3A). En liposomas con relaciones de EPC/SM/CHOL, 52:18:30 y 37:18:45 se observó también que el efecto mayor se dio con los péptidos 162 y 163, aunque los valores de liberación de contenidos observados para estos liposomas se redujeron comparados con los anteriores (P-I, figura 3B y 3C). Conforme la relación EPC/CHOL disminuyó, es decir el contenido de colesterol aumentó, los valores de liberación de contenidos disminuyeron. Con los liposomas compuestos de EPC/SM a una relación molar de 5:1 se observó otra vez que los péptidos 162 y 163 son los que presentaron el efecto más significativo de liberación de contenidos (P-I, Figura 3D). Como anteriormente hicimos con el dominio S1 de la glicoproteína S del SARS-CoV, estudiamos la liberación de contenidos intraliposomales producida por los péptidos derivados del dominio S2 con lípidos procedentes de un extracto lipídico de neumocitos de tejido pulmonar y a diferentes relaciones lípido/péptido (P-I, Figura 4B). Se pudo observar que el porcentaje de liberación de contenidos se redujo en comparación con los sistemas modelo estudiados anteriormente. Sin embargo, se observó que los péptidos 162 y 163 tuvieron un efecto significativo en la liberación de contenidos, y que en esta mezcla de fosfolípidos el péptido 119 produjo una liberación de contenidos significativa, lo cual no se observaba anteriormente con las otras composiciones lipídicas estudiadas.

El momento hidrofóbico mide la periodicidad de la distribución de los residuos a lo largo de un elemento de estructura secundaria (Eisenberg *et al.*, 1984, Eisenberg *et al.*, 1982). La orientación preferente de los momentos hidrofóbicos hacia una cara de este elemento (P-I, Figura 5A) se propone a favor de las interacciones hidrofóbicas entre proteínas y/o entre proteínas y membranas. Para detectar superficies a lo largo del dominio S2 de la glicoproteína S que podrían identificarse como zonas de interacción con membranas, hemos representado los momentos hidrofóbicos, hidrofobicidad e interfacialidad frente a la secuencia de aminoácidos del dominio S2, suponiendo que adopta una estructura en α -hélice a lo largo de la secuencia entera (P-I, Figura 5A). Es evidente la existencia de tres regiones diferentes con altos valores positivos que cubren la superficie de la hélice y a lo largo de ella: una de estas regiones está localizada inmediatamente antes de la región HR1 (región 1, R1), otra localizada entre las heptadas repetidas HR1 y HR2, (región 2, R2) y la otra al final de la secuencia del dominio S2 (región 3, R3). Esta última región solapa parcialmente con el dominio transmembrana propuesto en la glicoproteína *spike*. Además también se pueden observar otras dos regiones con altos valores de hidrofobicidad y momento hidrofóbico, que no están resaltadas en la figura, una zona anterior a la región 1 y que estaría justo en el límite que separaría el dominio S1 y el dominio S2 (región pre-1) y otra zona situada entre la región 1 y la región 2 y que estaría al comienzo de la primera región de heptadas repetidas (HR1). Como se ha comentado anteriormente, los péptidos 113, 119, 123, 147 y 162/163 son los péptidos que ejercieron el efecto más significativo en membranas modelo. Curiosamente los péptidos 113 (⁸²⁸ARDLICAQKFNGTLTVL⁸⁴³) y 123 (⁸⁹⁷VLYENQKQIANQFNKAI⁹¹³) están localizados cerca de la región 1, el péptido 119 (⁸⁷³GAALQIPFAMQMAYRF⁸⁸⁸) está localizado en la región 1, el péptido 147 (¹⁰⁷⁷FVFNGTSWFITQRNFF¹⁰⁹²) se encuentra en la región 2, mientras que los péptidos 162 y 163 (¹¹⁸⁵LGKYEQYIKWPWYVWLG¹²⁰² / ¹¹⁹³KWPWYVWLGFIAGLIAIV¹²¹⁰) están localizados en la región 3. Todas estas regiones representan superficies con altos valores de transferencia de energía libre de bicapa a agua. El péptido 119 que hemos mostrado en este trabajo, y que tuvo un efecto membranotrópico significativo, pertenece a la Región 1 señalada en (P-I, Figura 5A) y comprende los residuos 873-888 del dominio S2 de la glicoproteína S del SARS-CoV. Este péptido solapa la secuencia teóricamente predicha como FP 858-886 (Bosch *et al.*, 2004), y es así un candidato a ser un péptido de fusión de la glicoproteína S del SARS-CoV. Sin

embargo, estudios recientes han mostrado que la región comprendida entre los residuos 770 y 788 tiene una actividad fusogénica mayor que la secuencia anterior, por lo que se ha sugerido que sería otro péptido de fusión de la glicoproteína S2 (Sainz et al., 2005). En nuestro estudio no encontramos ningún péptido, en la región descrita por estos autores, que tenga un efecto significativo de liberación de contenidos a pesar de encontrarse en la anteriormente descrita región pre-1, en la que los valores de hidrofobicidad y momento hidrofóbico son significativamente altos. Sin embargo, ningún péptido de nuestra librería solapa exactamente con el péptido descrito por Sainz et al., por lo que la ausencia de un efecto significativo en la liberación de contenidos podría estar indicando que los detalles de la secuencia podrían determinar la actividad de fusión de membranas de los péptidos. De hecho se ha observado en el caso del péptido de fusión de gp41 en VIH, que cambios de aminoácidos puntuales o deleciones de partes de la secuencia del péptido de fusión podrían eliminar su capacidad de promover liberación de contenidos y fusión en liposomas (Martin *et al.*, 1996, Pereira *et al.*, 1995).

Otra secuencia estructural y funcional fundamental para el mecanismo de fusión de Clase 1 es la pretransmembrana. Se han descrito varias secuencias PTM caracterizadas por ser una región inmediatamente adyacente al dominio transmembrana de las proteínas de fusión de Clase 1 y que poseen una alta proporción de residuos hidrofóbicos conservados e inusualmente ricos en triptófanos y tirosinas (Lorizate et al., 2008). Estas secuencias muestran una alta tendencia a incorporarse en membranas y son altamente fusogénicas. Los péptidos 162 y 163 del dominio S2 del SARS-CoV muestran un gran efecto en la liberación de contenidos de diferentes membranas modelo, y el análisis de las secuencias revela que comparten características con otros dominios PTM de diferentes virus (Figura 1), siendo notable el alto contenido en residuos aromáticos y un segmento interfacial inmediatamente seguido de uno hidrofóbico (P-I, Figura 6, parte superior). En el virus del SIDA se ha observado que aparte del péptido de fusión y el péptido pretransmembrana, otras regiones de la proteína interaccionan y desestabilizan la membrana viral y la huésped, así se ha sugerido que el bucle de gp41 situado entre la HR1 y la HR2, podría jugar un papel esencial en el proceso de fusión. En nuestro caso hemos encontrado un dominio altamente hidrofóbico e interfacial localizado entre la HR1 y HR2 (región 2), que podría tener un papel parecido al del bucle de gp41, así el péptido 147 pertenecería a este dominio.

Regiones pretransmembrana de proteínas de fusión de virus de clase I.

Coronaviridae	
SARS-CoV	-----LGR-YEQ--YIKWPWYVWL--GP
IBV	---DLEKLSI-LKT--YIKWPWYVWLAIAF
BcoV	-----KDIGT-YEY--YVKWPWYVWLLIGF
MHV	--YINLKEVGT-YEM--YVKWPWYVWL----
FIPV	-----EWLNR-IET--YVKWPWYVWLLI--
TGEV	--LVNLEWLNLR-IET--YVKWPWYVW----
HCoV-229E	---DLEWLNLR-VET--YIKWPWYVWL----
PEDV	---DLEWLNLR-VET--YIKWPWYVWLI---
Retroviridae	
HIV-1	---DKWASLWN-WFD--ITNWLWYIK-----
SIV	---NSWDVFGN-WFD--LAEWIKYIQ-----
MoMulv	---KLPESTQG-WFEGLEFNRSWFETT-----
HTLV-1	--NRVLTGWGLNWDLG-LSQWARRALQTG--
MPMV	-----IDNPPWTS--FHGFLEPYVMPLL--
SA-OMVV	-----WKALQEAQFDWEGWPEWLEKYIPW----
MMTV	-----PANGVKALNP--LDWTQYPIFI---
RouSV	-----SDPIGS-WLRGIFGGIGEMAV-----
Orthomyxoviridae	
FluA	-----KSGYKD-WIL-----WISFAISCF--
Paramyxoviridae	
HPIV2	KSAEDWIADEN-FFAN-QARTAKTLYSL---
HPIV3	---KEWIRRENQKLDL-IGNWHQS-----
Filoviridae	
Ebola	-----DNDN-WWT-----GWRQWIPAGIG-
Marburg	-IKKDEQKEGTGWGLG--GKWWTSDWG----

Figura 1. Secuencia de regiones pretransmembrana en proteínas de fusión de Clase 1. Los residuos aromáticos se resaltan en negrita. Las secuencias de las proteínas y los números de acceso de GenBank para los virus es como sigue: SARS-CoV (cepa SARS), P59594; IBV (virus de la bronquitis infecciosa de las aves, cepa Beaudette), P11223; BcoV (coronavirus bovino, cepa F15), P25190; MHV (coronavirus murino, cepa A59), P11224; FIPV (virus de la peritonitis felina infecciosa, cepa 79-1146), P10033; TGEV (virus de la gastroenteritis porcina transmisible, cepa Purdue), P07946; HCoV-229E (coronavirus humano, cepa 229E), P15423; PEDV (virus de la diarrea porcina epidémica, cepa Br1/87), Q84712; HIV-1 (virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, aislado MN), P05877; SIV (virus de la inmunodeficiencia del chimpancé, SIV(cpz)), Q88018; MoMulv (virus de la leucemia murina de Moloney), P03385; HTLV-I (virus de la leucemia de células T humanas tipo I, cepa ATK), P03381; MMTV (virus del tumor mamario de ratón, cepa BR6), P10259; MPMV (virus Mason-Pfizer del simio), P07575; SMRV (retrovirus squirrel del mono), P21412; SA-OMVV (lentivirus ovino, cepa SA-OMVV), P16899; RouSV (virus del sarcoma de Rous (cepa Prague C), P03396; FluA (virus de la Influenza A, cepa A/Aichi/2/68), P03437; HPIV1,2 y 3 (virus de la parainfluenza humana tipo 1, 2 y 3), P16071, P25467, P06828 respectivamente; Marburg (virus de Marburg, cepa Musoke), P35253; Ebola (virus del Ebola, cepa Eckron-76), P87671.

2. Caracterización biofísica de las regiones membrano-activas de la glicoproteína S del SARS-CoV.

De acuerdo a los resultados experimentales y teóricos obtenidos en el primer capítulo y a la bibliografía publicada sobre las posibles regiones del SARS-CoV implicadas en el proceso de fusión de membranas, decidimos estudiar varias secuencias procedentes del dominio S2 de la glicoproteína S del SARS-CoV, entre ellas las siguientes:

- Un péptido perteneciente al dominio aromático pretransmembrana de SARS-CoV. La importancia de segmentos pretransmembrana en el mecanismo de entrada viral ha sido demostrada en proteínas de fusión del virus de la inmunodeficiencia humana, el virus del Ébola, virus de la inmunodeficiencia felina, virus del herpes y virus de la estomatitis vesicular (Suarez *et al.*, 2000b, Saez-Cirion *et al.*, 2003, Giannecchini *et al.*, 2003, Galdiero *et al.*, 2007, Robison and Whitt, 2000, Munoz-Barroso *et al.*, 1999, Salzwedel *et al.*, 1999, Giannecchini *et al.*, 2004, Lorizate *et al.*, 2008, Suarez *et al.*, 2000a). La secuencia escogida SARS_{PTM} (¹¹⁸⁵LGKYEQYIKWPWYVWLG¹²⁰²) (P-II, Figura 1A) coincide con el péptido 162 descrito en la primera publicación (P-I, Figura 5).
- Un péptido perteneciente al péptido de fusión situado en la zona amino terminal del dominio S2, SARS_{FP} (⁷⁷⁰MWKTPTLKYFGGFNFSQIL⁷⁸⁸). Los péptidos de fusión de las proteínas de fusión suelen ser segmentos cortos de residuos hidrofóbicos, ricos en Gly y esenciales para la fusión. El péptido de fusión interactúa y se inserta en la membrana participando en los reordenamientos de lípidos que llevan a la hemifusión y la formación y estabilización del poro de fusión. En el caso del SARS-CoV se ha descrito una región justo en el amino terminal del dominio S2 que podría tratarse del péptido de fusión (Sainz *et al.*, 2005), esta zona coincide con una región con altos índices de momento hidrofóbico, hidrofobicidad e interfacialidad (P-III, Figura 1B).
- Un péptido perteneciente al péptido de fusión interno de SARS-CoV, situado en la región inmediatamente adyacente a la HR1. Aunque en principio se creía que las glicoproteínas de fusión virales interactuaban con la membrana solamente mediante el péptido de fusión N-terminal, muchos estudios indican la existencia de otros

segmentos del ectodominio que contribuyen al mecanismo de fusión (Moreno *et al.*, 2004, Perez-Berna *et al.*, 2006, Peisajovich *et al.*, 2000b, Peisajovich *et al.*, 2000a, Pascual *et al.*, 2005, Galdiero *et al.*, 2005, Suarez *et al.*, 2000a). Así, estudios de mutagénesis han demostrado también la importancia de una región localizada justo antes de la HR1, pues su mutación causa la inhibición de la fusión celular mediada por la glicoproteína S (Petit *et al.*, 2005). La secuencia escogida SARS_{IFP} (⁸⁷³GAALQIPFAMQMAYRF⁸⁸⁸) (Anexo-I, Figura 1) coincide con el péptido 119 descrito en la primera publicación (P-I, Figura 5).

2.1. Interacción del péptido pretransmembrana de la glicoproteína S del SARS-CoV con membranas.

El péptido SARS_{PTM} mostró coeficientes de partición de 10^4 - 10^5 para las diferentes composiciones de fosfolípidos estudiadas (P-II, Figura 2A) y (P-II, Tabla 1), no mostró ninguna especificidad por ningún lípido en particular. Además los residuos de Trp no se situaban accesibles a la fase acuosa según se comprobó mediante los experimentos de atenuación de fluorescencia mediante acrilamida, obteniéndose valores de K_{SV} bajos en todas las composiciones de fosfolípidos utilizadas (P-II, figura 2B) y (P-II, Tabla 1). Los estudios de atenuación mediante sondas lipofílicas 5-NS y 16-NS muestran que por lo general el péptido SARS_{PTM} se situaría en una posición interfacial en la membrana (P-II, Figura 3) y (P-II, Tabla 1). El péptido SARS_{PTM} produjo una liberación de contenidos mayor en los liposomas con EPC, Chol, y/o ESM, en cambio tuvo un efecto menor aunque significativo en las mezclas con fosfolípidos negativos (P-II, Figura 4A). El efecto de fusión y agregación fue mayor en las membranas con fosfolípidos negativos (P-II, Figuras 4B y 4C). Los estudios de FTIR mostraron una diferencia de estructuras dependiendo del tipo de membrana utilizado. En todos los casos se observó un aumento de la estructura en α -hélice y/o estructura desordenada, sin embargo el aumento fue mayor en el caso del DMPG, seguido del DMPC y con un aumento mucho menor para el DMPA. En el caso del DMPG y DMPC se puede observar un cambio de estructura, que tiene lugar al mismo tiempo que la transición de fase gel a líquido cristalina del fosfolípido. En el fosfolípido neutro DMPC, se da un cambio de estructura hacia un estado más agregado o de lámina β , sin embargo en el caso del fosfolípido negativo DMPG, se produce un cambio de

estructura agregada o lámina β a una mezcla de estructuras desordenadas y α -hélice (P-II, Figura 6).

2.2. Interacción del péptido de fusión de la glicoproteína S del SARS-CoV con membranas.

El péptido SARS_{FP} mostró coeficientes de partición de 10^6 solamente en el caso de fosfolípidos cargados negativamente. Sin embargo no puede descartarse una interacción del péptido con membranas zwitteriónicas, pues se observa un descenso de la intensidad, de la atenuación con acrilamida y un aumento del tiempo de vida del decaimiento de la fluorescencia del residuo de Trp del péptido en EPC (P-III, Figuras 2A y 3A) y (P-III, Tabla 2), indicando así que el péptido no interacciona de la misma forma con lípidos cargados negativamente que con lípidos neutros. Los datos de los estudios de atenuación con sondas lipofílicas indican una posición interfacial en la membrana para el péptido SARS_{FP} (P-III, Figura 3B). El tiempo de vida del DPH disminuye más en presencia del péptido SARS_{FP} en el fosfolípido cargado negativamente DMPG que en el zwitteriónico DMPC indicando una mayor perturbación de la membrana en el primer caso (P-III, Tabla 3). El péptido produce una liberación de contenidos y fusión mayor en el caso de membranas con fosfolípidos negativos. Además la perturbación del potencial de membrana causada por el péptido SARS_{FP} fue mayor en las mezclas con fosfolípidos negativos. La estructura predominante del péptido fue hojas β con fuertes interacciones intermoleculares.

2.3. Interacción del péptido interno de fusión de la glicoproteína S del SARS-CoV con membranas.

El péptido SARS_{IFP} mostró coeficientes de partición de 10^5 - 10^6 para membranas con fosfolípidos negativos y algo menores (10^4) para membranas zwitteriónicas (An-I, Figura 2A). La anisotropía del residuo de Tyr del péptido en presencia de fosfolípidos cargados negativamente fue mayor que en fosfolípidos zwitteriónicos (An-I, Figura 2B). El residuo de Tyr del péptido no se encuentra accesible a la fase acuosa en presencia de membranas según se muestra en los experimentos de atenuación con acrilamida (An-I, Figura 2C). El péptido SARS_{IFP} afectó de forma más significativa las membranas con fosfolípidos zwitteriónicos que las que contenían fosfolípidos cargados negativamente

(An-I, Figura 2D), indicando una mayor perturbación en la membrana en el primer caso. El péptido causó un aumento de la anisotropía de las sondas PA-DPH y DPH solamente en fosfolípidos negativos DMPG, DMPS y DMPA (An-I, Figura 3), además produjo una disminución en la frecuencia de la banda simétrica del CH₂ o CD₂ en los fosfolípidos negativos DMPG y DMPA mientras que en el caso del fosfolípido zwitteriónico DMPC se observó un aumento en la frecuencia de la banda simétrica del CH₂. Mediante ³¹P MAS RMN se observó que en una mezcla de POPC/EPA el péptido aumentó específicamente la anchura a mitad de banda del EPA y no del POPC. La estructura del péptido en fosfolípidos cargados negativamente DMPA y DMPG mostró un componente mayoritario en forma de agregados. Sin embargo en el caso del DMPC, aunque a relaciones bajas lípido/péptido predominó también el componente agregado, el péptido mostró una flexibilidad estructural mayor, pues cambió significativamente con la temperatura y a relaciones lípido/péptido mayores, produciéndose una desagregación del péptido y apareciendo otros componentes como estructura desordenada y/o hélice α . Los datos de dicroísmo circular confirmaron esta flexibilidad estructural del péptido, pues se observó que en presencia de diferentes lípido miméticos, aumentaba la proporción de hélice α respecto a las estructuras de lámina β .

DISCUSIÓN

La fusión de la membrana viral con la membrana huésped para dar lugar a la entrada del virus en la célula huésped es un proceso energéticamente desfavorable. Así pues, es necesaria la participación de una maquinaria especializada en el virus para facilitar este proceso. Las proteínas de fusión son estas máquinas especializadas que a lo largo de la evolución han sido seleccionadas por su habilidad para ayudar al virus a sortear la barrera que supone la membrana celular. En los últimos años se ha observado que dentro de las proteínas de fusión pueden existir varias regiones capaces de interactuar con la membrana, ayudando así a superar las barreras energéticas impuestas por la membrana celular. En el trabajo presentado en esta tesis se identificaron varias secuencias dentro del dominio S2, que es el encargado de la fusión de membranas, responsables de este proceso de fusión. Aunque todas ellas presentan características comunes, de interacción y unión con membranas, se han visto diferencias que podrían dar idea de sus diferentes papeles en

el proceso de fusión. Según lo datos obtenidos un posible mecanismo de acción de estas regiones sería el siguiente:

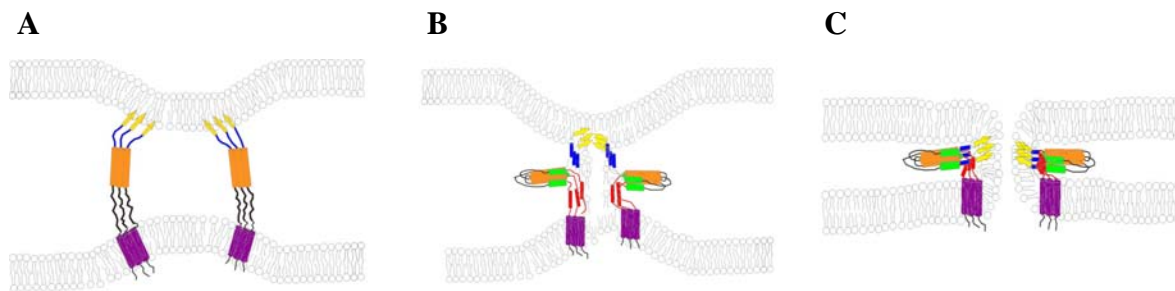


Figura 1. Modelo hipotético de la fusión del SARS-CoV basado en los datos disponibles del SARS-CoV y otros virus de clase I. El péptido de fusión (amarillo) se inserta en la célula huésped (A). A continuación tiene lugar la formación del intermediario preheorquilla, el núcleo se pliega en el ovillo de 6 hélices con la región HR2 (verde) empaquetada en forma antiparalela en los surcos del trímero HR1 (naranja), con la consiguiente inducción de la hemifusión (B). El péptido interno de fusión (azul) y el dominio pretransmembrana (rojo) podrían facilitar la formación del poro de fusión facilitando la desestabilización en fases tardías del proceso de fusión de membranas. Finalmente, el poro de fusión es estabilizado por las regiones anteriores y la fusión se completa (C).

En primer lugar el primer péptido de fusión ($SARS_{FP}$) interactuaría primero con los lípidos de la hemicapa externa, mayoritariamente zwiteriónicos, produciendo una desestabilización de la membrana, posteriormente se produciría un contacto con los fosfolípidos negativos de la hemicapa interna bien por movimientos de flip-flop de los lípidos o por huecos formados en la membrana. Este contacto con los fosfolípidos negativos facilitaría que el péptido promoviera una agregación, acercando las hemicapas externas de las membranas huésped y viral, y posteriormente induciendo el contacto de las hemicapas internas con la consiguiente fusión. Mientras tanto el péptido interno de fusión ($SARS_{IFP}$) podría asistir en este proceso, pues tras el primer contacto con la membrana del primer péptido de fusión, ayudaría en la desestabilización de los fosfolípidos zwiteriónicos de la membrana externa. Los cambios conformacionales que tendrían lugar en el péptido al interactuar con la membrana podrían ayudar a superar las barreras energéticas del proceso de fusión. Tras la formación del poro de fusión, este péptido interno podría contactar con los lípidos negativos provocando una estabilización en la membrana y con ello una estabilización y agrandamiento del poro de fusión que daría lugar a la entrada del

virus a la célula huésped. La región pretransmembrana también jugaría un papel importante en este proceso, pues a la vez que el péptido de fusión (SARS_{FP}) contacta con la membrana huésped, ésta lo haría a su vez con la membrana viral, produciendo su desestabilización y posterior fusión con la membrana huésped, facilitado por la capacidad de promover agregación y fusión en presencia de fosfolípidos negativos del péptido pretransmembrana (SARS_{PTM}). Los cambios conformacionales que tiene lugar en esta región tras interactuar con la membrana ayudarían de un modo similar a como lo hace el péptido SARS_{IFP} . En la figura 1 se muestra un modelo del hipotético proceso de fusión, y se indican las regiones estudiadas en la presente tesis, así como su posible papel en dicho proceso.



Capítulo



Conclusiones /Conclusions



CONCLUSIONES

1. Hemos identificado en el dominio S2 de la glicoproteína S del SARS-CoV varias regiones capaces de perturbar la membrana. Estas regiones membranotrópicas podrían jugar un papel importante en la fusión de membranas.
2. En la glicoproteína S del SARS-CoV existe una región pretransmembrana al igual que en otros virus, que estaría implicada en el proceso de fusión.
3. El péptido pretransmembrana se une con e inserta en membranas sin una clara especificidad por un determinado tipo de lípidos.
4. El efecto de agregación y fusión de membranas ejercido por el péptido pretransmembrana es dependiente de fosfolípidos cargados negativamente.
5. El péptido pretransmembrana sufre un cambio conformacional inducido por los fosfolípidos en los que se encuentra incorporado.
6. En la glicoproteína S del SARS-CoV existe un péptido de fusión N-terminal situado justamente en la separación de los dominios S1 y S2.
7. El péptido de fusión interactúa, perturba y produce fusión de una forma dependiente de fosfolípidos cargados negativamente.
8. Las estructuras predominantes en el péptido de fusión del SARS-CoV serían láminas β y/o β -agregados.
9. En la glicoproteína S del SARS-CoV existe un péptido de fusión interno, adyacente a la HR1 que podría asistir en el proceso de fusión junto con las otras regiones anteriormente descritas.
10. El péptido de fusión interno se une preferentemente a fosfolípidos aniónicos, aunque también lo hace con menor grado en zwitteriónicos.
11. El péptido de fusión interno forma estructuras de tipo agregado en presencia de fosfolípidos cargados negativamente, incrementando el orden de las cadenas acílicas y restringiendo la movilidad de las cabezas polares.
12. En presencia de fosfolípidos zwitteriónicos, el péptido de fusión interno causa una mayor perturbación en la membrana y posee una mayor flexibilidad estructural, pudiendo sufrir transiciones α -hélice/ β -agregado dependiendo del ambiente lipídico.

CONCLUSIONS

1. We have identified in the S2 domain of the SARS-CoV S glycoprotein several regions which are able to perturb the membrane. These membranotropic regions should play an essential role in membrane fusion.
2. In the SARS-CoV S glycoprotein there is a pretransmembrane region similarly to other viruses, which would be implicated in the fusion process.
3. The pretransmembrane peptide binds with and inserts into membranes without any clear specificity for a particular type of lipid.
4. The aggregation and fusion effect of membranes exerted by the pretransmembrane peptide is dependent on negatively charged phospholipids.
5. The pretransmembrane peptide undergoes a conformational change induced by the surrounding phospholipids.
6. In the SARS-CoV S glycoprotein exists a N-terminal fusion peptide situated in the boundary of the S1 and S2 domains.
7. The fusion peptide interacts, perturbs and causes fusion modulated by negatively charged phospholipids.
8. The predominant structures in the SARS-CoV fusion peptide would be either β sheets and/or β -aggregates.
9. In the SARS-CoV S glycoprotein exists an internal fusion peptide, immediately adjacent to the HR1 which would be able to assist in the fusion process together with the other regions described above.
10. The internal fusion peptide binds preferentially to anionic phospholipids, and in a lesser extent to zwitterionic lipids.
11. The internal fusion peptide forms aggregated structures in the presence of negatively-charged phospholipids, increasing the acyl chain order but restricting head group mobility.
12. In the presence of zwitterionic lipids, the internal fusion peptide causes a greater perturbation in the membrane and exhibits a highly structural flexibility, changing between α -helix/ β -aggregate depending upon their lipidic environment.



Capítulo

VI



Bibliografía

Bibliografía

Alberts, A. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. *Garland Science, New York*.

Arbely, E., Khattari, Z., Brotons, G., Akkawi, M., Salditt, T. & Arkin, I.T. (2004) A highly unusual palindromic transmembrane helical hairpin formed by SARS coronavirus E protein. *J Mol Biol*, **341**, 769-779.

Armstrong, J., Niemann, H., Smeekens, S., Rottier, P. & Warren, G. (1984) Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature*, **308**, 751-752.

Arrondo, J.L. & Goni, F.M. (1999) Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Prog Biophys Mol Biol*, **72**, 367-405.

Arrondo, J.L., Muga, A., Castresana, J. & Goni, F.M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog Biophys Mol Biol*, **59**, 23-56.

Babcock, G.J., Esshaki, D.J., Thomas, W.D., Jr. & Ambrosino, D.M. (2004) Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor. *J Virol*, **78**, 4552-4560.

Bach, D. & Wachtel, E. (2003) Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites. *Biochim Biophys Acta*, **1610**, 187-197.

Bangham, A.D., Standish, M.M. & Watkins, J.C. (1965a) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*, **13**, 238-252.

Bangham, A.D., Standish, M.M. & Weissmann, G. (1965b) The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *J Mol Biol*, **13**, 253-259.

Barth, A. (2000) The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog Biophys Mol Biol*, **74**, 141-173.

Bartlam, M., Yang, H. & Rao, Z. (2005) Structural insights into SARS coronavirus proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 664-672.

Basanez, G. (2002) Membrane fusion: the process and its energy suppliers. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 1478-1490.

Beniac, D.R., Andonov, A., Grudeski, E. & Booth, T.F. (2006) Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 751-752.

VI. Bibliografía

Blume, A. (1993) Phospholipid handbook. *Marcel Dekker, New York*, **Chap Dynamics properties**.

Bosch, B.J., Martina, B.E., Van Der Zee, R., Lepault, J., Haijema, B.J., Versluis, C., Heck, A.J., De Groot, R., Osterhaus, A.D. & Rottier, P.J. (2004) Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8455-8460.

Bournsnel, M.E., Brown, T.D., Foulds, I.J., Green, P.F., Tomley, F.M. & Binns, M.M. (1987) Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J Gen Virol*, **68 (Pt 1)**, 57-77.

Brezesinski, G. & Mohwald, H. (2003) Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Adv Colloid Interface Sci*, **100-102**, 563-584.

Brockman, H. (1994) Dipole Potential of Lipid-Membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, **73**, 57-79.

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

Brown, D.A. & London, E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, **275**, 17221-17224.

Butko, P., Huang, F., Pusztai-Carey, M. & Surewicz, W.K. (1996) Membrane permeabilization induced by cytolytic delta-endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. *Biochemistry*, **35**, 11355-11360.

Byler, D.M. & Susi, H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, **25**, 469-487.

Cameron, David, G., Moffatt & Douglas, J. (1987) A generalized approach to derivative spectroscopy. *Appl Spec*, **41**, 539-544.

Cameron, D.G., Martin, A., Moffatt, D.J. & Mantsch, H.H. (1985) Infrared spectroscopic study of the gel to liquid-crystal phase transition in live *Acholeplasma laidlawii* cells. *Biochemistry*, **24**, 4355-4359.

Cevc, G. & Sedden, J. (1993) Phospholipid Handbook. *Marcel Dekker, New York*, 351-454.

Cladera, J., Martin, I., Ruysschaert, J.M. & O'Shea, P. (1999) Characterization of the sequence of interactions of the fusion domain of the simian immunodeficiency virus with membranes. Role of the membrane dipole potential. *J Biol Chem*, **274**, 29951-29959.

Cladera, J. & O'Shea, P. (1998) Intramembrane molecular dipoles affect the membrane insertion and folding of a model amphiphilic peptide. *Biophys J*, **74**, 2434-2442.

- Clarke, R.J. & Kane, D.J. (1997) Optical detection of membrane dipole potential: avoidance of fluidity and dye-induced effects. *Biochim Biophys Acta*, **1323**, 223-239.
- Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., Yagil, C., Koziaradski, I., Scanga, S.E., Oliveira-dos-Santos, A.J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C.M., Manoukian, A.S., Chappell, M.C., Backx, P.H., Yagil, Y. & Penninger, J.M. (2002) Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, **417**, 822-828.
- Chan, V.S., Chan, K.Y., Chen, Y., Poon, L.L., Cheung, A.N., Zheng, B., Chan, K.H., Mak, W., Ngan, H.Y., Xu, X., Screaton, G., Tam, P.K., Austyn, J.M., Chan, L.C., Yip, S.P., Peiris, M., Khoo, U.S. & Lin, C.L. (2006) Homozygous L-SIGN (CLEC4M) plays a protective role in SARS coronavirus infection. *Nat Genet*, **38**, 38-46.
- Chernomordik, L.V. & Kozlov, M.M. (2003) Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem*, **72**, 175-207.
- Chinese, S.M.E.C. (2004) Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science*, **303**, 1666-1669.
- Damjanovich, S., Vereb, G., Schaper, A., Jenei, A., Matko, J., Starink, J.P., Fox, G.Q., Arndt-Jovin, D.J. & Jovin, T.M. (1995) Structural hierarchy in the clustering of HLA class I molecules in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1122-1126.
- de Kruijff, B. (1997) Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr Opin Chem Biol*, **1**, 564-569.
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H. & Doerr, H.W. (2003) Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, **348**, 1967-1976.
- Duff, K.C. & Ashley, R.H. (1992) The transmembrane domain of influenza A M2 protein forms amantadine-sensitive proton channels in planar lipid bilayers. *Virology*, **190**, 485-489.
- Duff, K.C., Gilchrist, P.J., Saxena, A.M. & Bradshaw, J.P. (1994) Neutron diffraction reveals the site of amantadine blockade in the influenza A M2 ion channel. *Virology*, **202**, 287-293.
- Eftink, M.R. & Ghiron, C.A. (1976) Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry*, **15**, 672-680.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. & Wall, R. (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol*, **179**, 125-142.

VI. Bibliografía

Eisenberg, D., Weiss, R.M. & Terwilliger, T.C. (1982) The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, **299**, 371-374.

Eleouet, J.F., Rasschaert, D., Lambert, P., Levy, L., Vende, P. & Laude, H. (1995) Complete sequence (20 kilobases) of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible gastroenteritis virus. *Virology*, **206**, 817-822.

Epand, R.M. (1998) Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta*, **1376**, 353-368.

Ewart, G.D., Sutherland, T., Gage, P.W. & Cox, G.B. (1996) The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J Virol*, **70**, 7108-7115.

Fernandes, M.X. & de la Torre, J.G. (2002) Brownian dynamics simulation of rigid particles of arbitrary shape in external fields. *Biophys J*, **83**, 3039-3048.

Fielding, B.C., Tan, Y.J., Shuo, S., Tan, T.H., Ooi, E.E., Lim, S.G., Hong, W. & Goh, P.Y. (2004) Characterization of a unique group-specific protein (U122) of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, **78**, 7311-7318.

Fischer, F., Stegen, C.F., Masters, P.S. & Samsonoff, W.A. (1998) Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *J Virol*, **72**, 7885-7894.

Florine-Casteel, K. & Feigenson, G.W. (1988) On the use of partition coefficients to characterize the distribution of fluorescent membrane probes between coexisting gel and fluid lipid phase: an analysis of the partition behavior of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene. *Biochim Biophys Acta*, **941**, 102-106.

Fluhler, E., Burnham, V.G. & Loew, L.M. (1985) Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry*, **24**, 5749-5755.

Follis, K.E., York, J. & Nunberg, J.H. (2006) Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. *Virology*, **350**, 358-369.

Frana, M.F., Behnke, J.N., Sturman, L.S. & Holmes, K.V. (1985) Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. *J Virol*, **56**, 912-920.

Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M., Browne, H., Pedone, C. & Galdiero, M. (2005) Fusogenic domains in herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J Biol Chem*, **280**, 28632-28643.

Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M., D'Isanto, M., Collins, C., Orrei, V., Browne, H., Pedone, C. & Galdiero, M. (2007) Evidence for a role of the membrane-proximal region of

herpes simplex virus Type 1 glycoprotein H in membrane fusion and virus inhibition. *Chembiochem*, **8**, 885-895.

Garbino, J., Crespo, S., Aubert, J.D., Rochat, T., Ninet, B., Deffernez, C., Wunderli, W., Pache, J.C., Soccac, P.M. & Kaiser, L. (2006) A prospective hospital-based study of the clinical impact of non-severe acute respiratory syndrome (Non-SARS)-related human coronavirus infection. *Clin Infect Dis*, **43**, 1009-1015.

Geng, H., Liu, Y.M., Chan, W.S., Lo, A.W., Au, D.M., Waye, M.M. & Ho, Y.Y. (2005) The putative protein 6 of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus: expression and functional characterization. *FEBS Lett*, **579**, 6763-6768.

Giannecchini, S., Bonci, F., Pistello, M., Matteucci, D., Sichi, O., Rovero, P. & Bendinelli, M. (2004) The membrane-proximal tryptophan-rich region in the transmembrane glycoprotein ectodomain of feline immunodeficiency virus is important for cell entry. *Virology*, **320**, 156-166.

Giannecchini, S., Di Fenza, A., D'Ursi, A.M., Matteucci, D., Rovero, P. & Bendinelli, M. (2003) Antiviral activity and conformational features of an octapeptide derived from the membrane-proximal ectodomain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein. *J Virol*, **77**, 3724-3733.

Godet, M., L'Haridon, R., Vautherot, J.F. & Laude, H. (1992) TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*, **188**, 666-675.

Gramberg, T., Hofmann, H., Moller, P., Lalor, P.F., Marzi, A., Geier, M., Krumbiegel, M., Winkler, T., Kirchhoff, F., Adams, D.H., Becker, S., Munch, J. & Pohlmann, S. (2005) LSECTin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology*, **340**, 224-236.

Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P. & Rowlands, D.J. (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*, **535**, 34-38.

Gross, E., Bedlack, R.S., Jr. & Loew, L.M. (1994) Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential. *Biophys J*, **67**, 208-216.

Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., Liu, X.L., Zhuang, Z.X., Cheung, C.L., Luo, S.W., Li, P.H., Zhang, L.J., Guan, Y.J., Butt, K.M., Wong, K.L., Chan, K.W., Lim, W., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Peiris, J.S. & Poon, L.L. (2003) Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, **302**, 276-278.

Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M.L., Lely, A.T., Navis, G.J. & van Goor, H. (2004) Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*, **203**, 631-637.

VI. Bibliografía

He, R., Leeson, A., Andonov, A., Li, Y., Bastien, N., Cao, J., Osiowy, C., Dobie, F., Cutts, T., Ballantine, M. & Li, X. (2003) Activation of AP-1 signal transduction pathway by SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **311**, 870-876.

Herold, J., Raabe, T., Schelle-Prinz, B. & Siddell, S.G. (1993) Nucleotide sequence of the human coronavirus 229E RNA polymerase locus. *Virology*, **195**, 680-691.

Hinz, H.J., Kутtenreich, H., Meyer, R., Renner, M., Frund, R., Koynova, R., Boyanov, A.I. & Tenchov, B.G. (1991) Stereochemistry and size of sugar head groups determine structure and phase behavior of glycolipid membranes: densitometric, calorimetric, and X-ray studies. *Biochemistry*, **30**, 5125-5138.

Hofmann, H. & Pohlmann, S. (2004) Cellular entry of the SARS coronavirus. *Trends Microbiol*, **12**, 466-472.

Holmes, K.V. (2003) SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *J Clin Invest*, **111**, 1605-1609.

Huang, C., Ito, N., Tseng, C.T. & Makino, S. (2006) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J Virol*, **80**, 7287-7294.

Hwang, J., Gheber, L.A., Margolis, L. & Edidin, M. (1998) Domains in cell plasma membranes investigated by near-field scanning optical microscopy. *Biophys J*, **74**, 2184-2190.

Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., Crackower, M.A., Fukamizu, A., Hui, C.C., Hein, L., Uhlig, S., Slutsky, A.S., Jiang, C. & Penninger, J.M. (2005) Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, **436**, 112-116.

Ingallinella, P., Bianchi, E., Finotto, M., Cantoni, G., Eckert, D.M., Supekar, V.M., Bruckmann, C., Carfi, A. & Pessi, A. (2004) Structural characterization of the fusion-active complex of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8709-8714.

Israelachvili, J.N., Marcelja, S. & Horn, R.G. (1980) Physical principles of membrane organization. *Q Rev Biophys*, **13**, 121-200.

Ito, N., Mossel, E.C., Narayanan, K., Popov, V.L., Huang, C., Inoue, T., Peters, C.J. & Makino, S. (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. *J Virol*, **79**, 3182-3186.

Ito, T., Yamazaki, M. & Ohnishi, S. (1989) Osmoelastic coupling in biological structures: a comprehensive thermodynamic analysis of the osmotic response of phospholipid vesicles and a reevaluation of the "dehydration force" theory. *Biochemistry*, **28**, 5626-5630.

Jeffers, S.A., Tusell, S.M., Gillim-Ross, L., Hemmila, E.M., Achenbach, J.E., Babcock, G.J., Thomas, W.D., Jr., Thackray, L.B., Young, M.D., Mason, R.J., Ambrosino, D.M., Wentworth, D.E., Demartini, J.C. & Holmes, K.V. (2004) CD209L (L-SIGN) is a receptor

- for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 15748-15753.
- Jones, M.N. (1995) The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Adv Colloid Interface Sci*, **54**, 93-128.
- Kaganer, V.M., Möhwald, H. & Dutta, P. (1999) Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. *Rev. Mod. Phys.*, **71** 779-819.
- Kelly, S.M., Jess, T.J. & Price, N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, **1751**, 119-139.
- Khattari, Z., Brotons, G., Akkawi, M., Arbely, E., Arkin, I.T. & Salditt, T. (2006) SARS coronavirus E protein in phospholipid bilayers: an x-ray study. *Biophys J*, **90**, 2038-2050.
- Kielian, M. (2006) Class II virus membrane fusion proteins. *Virology*, **344**, 38-47.
- Killian, J.A., Borle, F., de Kruijff, B. & Seelig, J. (1986) Comparative ²H- and ³¹P-NMR study on the properties of palmitoyllysophosphatidylcholine in bilayers with gramicidin, cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta*, **854**, 133-142.
- Kopecky-Bromberg, S.A., Martinez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R.A. & Palese, P. (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J Virol*, **81**, 548-557.
- Kozlov, M.M., Leikin, S.L., Chernomordik, L.V., Markin, V.S. & Chizmadzhev, Y.A. (1989) Stalk mechanism of vesicle fusion. Intermixing of aqueous contents. *Eur Biophys J*, **17**, 121-129.
- Krimm, S. & Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv Protein Chem*, **38**, 181-364.
- Ksiazek, T.G., Erdman, D., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J.A., Lim, W., Rollin, P.E., Dowell, S.F., Ling, A.E., Humphrey, C.D., Shieh, W.J., Guarner, J., Paddock, C.D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J.Y., Cox, N., Hughes, J.M., LeDuc, J.W., Bellini, W.J. & Anderson, L.J. (2003) A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, **348**, 1953-1966.
- Kuhn, J.H., Li, W., Choe, H. & Farzan, M. (2004) Angiotensin-converting enzyme 2: a functional receptor for SARS coronavirus. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 2738-2743.
- Kuiken, T., Fouchier, R.A., Schutten, M., Rimmelzwaan, G.F., van Amerongen, G., van Riel, D., Laman, J.D., de Jong, T., van Doornum, G., Lim, W., Ling, A.E., Chan, P.K., Tam, J.S., Zambon, M.C., Gopal, R., Drosten, C., van der Werf, S., Escriou, N., Manuguerra, J.C., Stohr, K., Peiris, J.S. & Osterhaus, A.D. (2003) Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, **362**, 263-270.

VI. Bibliografía

Lai, M.M. & Cavanagh, D. (1997) The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*, **48**, 1-100.

Lakowicz, J.R. (1999) Principles of fluorescence spectroscopy. *2nd Edition, Plenum Press, New York*.

Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C. & Jahn, R. (2001) SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J*, **20**, 2202-2213.

Langmuir, I. (1917) Constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *J.Am.Chem.Soc.* , **39**, 1848-1906.

Lau, S.K., Woo, P.C., Li, K.S., Huang, Y., Tsoi, H.W., Wong, B.H., Wong, S.S., Leung, S.Y., Chan, K.H. & Yuen, K.Y. (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 14040-14045.

Law, H.K., Cheung, C.Y., Ng, H.Y., Sia, S.F., Chan, Y.O., Luk, W., Nicholls, J.M., Peiris, J.S. & Lau, Y.L. (2005) Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood*, **106**, 2366-2374.

Lee, D.C. & Chapman, D. (1986) Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. *Biosci Rep*, **6**, 235-256.

Lee, H.J., Shieh, C.K., Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., La Monica, N., Tuler, J., Bagdzhadzhyan, A. & Lai, M.M. (1991) The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase. *Virology*, **180**, 567-582.

Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., Choe, H. & Farzan, M. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, **426**, 450-454.

Liu, D.X., Cavanagh, D., Green, P. & Inglis, S.C. (1991) A polycistronic mRNA specified by the coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*, **184**, 531-544.

Liu, D.X. & Inglis, S.C. (1991) Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. *Virology*, **185**, 911-917.

Liu, S., Xiao, G., Chen, Y., He, Y., Niu, J., Escalante, C.R., Xiong, H., Farmar, J., Debnath, A.K., Tien, P. & Jiang, S. (2004) Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet*, **363**, 938-947.

Locker, J.K., Griffiths, G., Horzinek, M.C. & Rottier, P.J. (1992) O-glycosylation of the coronavirus M protein. Differential localization of sialyltransferases in N- and O-linked glycosylation. *J Biol Chem*, **267**, 14094-14101.

- Loew, L.M., Scully, S., Simpson, L. & Waggoner, A.S. (1979) Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential. *Nature*, **281**, 497-499.
- Lorizate, M., Huarte, N., Saez-Cirion, A. & Nieva, J.L. (2008) Interfacial pre-transmembrane domains in viral proteins promoting membrane fusion and fission. *Biochim Biophys Acta*.
- Lu, W., Zheng, B.J., Xu, K., Schwarz, W., Du, L., Wong, C.K., Chen, J., Duan, S., Deubel, V. & Sun, B. (2006) Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12540-12545.
- Macdonald, P.M., Leisen, J. & Marassi, F.M. (1991) Response of phosphatidylcholine in the gel and liquid-crystalline states to membrane surface charges. *Biochemistry*, **30**, 3558-3566.
- Macneughton, M.R. & Davies, H.A. (1978) Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles. *J Gen Virol*, **39**, 545-549.
- Machamer, C.E., Grim, M.G., Esquela, A., Chung, S.W., Rolls, M., Ryan, K. & Swift, A.M. (1993) Retention of a cis Golgi protein requires polar residues on one face of a predicted alpha-helix in the transmembrane domain. *Mol Biol Cell*, **4**, 695-704.
- Machamer, C.E., Mentone, S.A., Rose, J.K. & Farquhar, M.G. (1990) The E1 glycoprotein of an avian coronavirus is targeted to the cis Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 6944-6948.
- Maget-Dana, R. (1999) The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1462**, 109-140.
- Mantsch, H.H., Casal, H.L. & Jones, R.N. (1986) Resolution enhancement of infrared spectra of biological systems. *Adv infrared Raman spec*, **13**, 1-46.
- Mantsch, H.H. & McElhaney, R.N. (1991) Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem Phys Lipids*, **57**, 213-226.
- Marassi, F.M. & Macdonald, P.M. (1991) Response of the headgroup of phosphatidylglycerol to membrane surface charge as studied by deuterium and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, **30**, 10558-10566.
- Marra, M.A., Jones, S.J., Astell, C.R., Holt, R.A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y.S., Khattra, J., Asano, J.K., Barber, S.A., Chan, S.Y., Cloutier, A., Coughlin, S.M., Freeman, D., Girn, N., Griffith, O.L., Leach, S.R., Mayo, M., McDonald, H., Montgomery, S.B., Pandoh, P.K., Petrescu, A.S., Robertson, A.G., Schein, J.E., Siddiqui, A., Smailus, D.E., Stott, J.M., Yang, G.S., Plummer, F., Andonov, A., Artsob, H., Bastien, N., Bernard, K., Booth, T.F., Bowness, D., Czub, M., Drebot, M., Fernando, L., Flick, R., Garbutt, M., Gray, M., Grolla, A., Jones, S., Feldmann, H., Meyers, A., Kabani, A., Li, Y., Normand, S., Stroher, U., Tipples, G.A., Tyler, S., Vogrig, R., Ward, D., Watson, B., Brunham, R.C.,

VI. Bibliografia

Krajden, M., Petric, M., Skowronski, D.M., Upton, C. & Roper, R.L. (2003) The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, **300**, 1399-1404.

Marsh, D. (1980) Molecular motion in phospholipid bilayers in the gel phase: long axis rotation. *Biochemistry*, **19**, 1632-1637.

Martin, I., Schaal, H., Scheid, A. & Ruyschaert, J.M. (1996) Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer. *J Virol*, **70**, 298-304.

Marzi, A., Gramberg, T., Simmons, G., Moller, P., Rennekamp, A.J., Krumbiegel, M., Geier, M., Eisemann, J., Turza, N., Saunier, B., Steinkasserer, A., Becker, S., Bates, P., Hofmann, H. & Pohlmann, S. (2004) DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, **78**, 12090-12095.

Mathivet, L., Cribier, S. & Devaux, P.F. (1996) Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophys J*, **70**, 1112-1121.

Matsuzaki, K., Murase, O., Sugishita, K., Yoneyama, S., Akada, K., Ueha, M., Nakamura, A. & Kobayashi, S. (2000) Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. *Biochim Biophys Acta*, **1467**, 219-226.

Mayer, L.D., Hope, M.J. & Cullis, P.R. (1986) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta*, **858**, 161-168.

Mohanty, A.K., Bishop, C.M., Bishop, T.C., Wimley, W.C. & Wiener, M.C. (2003) Enzymatic E-colicins bind to their target receptor BtuB by presentation of a small binding epitope on a coiled-coil scaffold. *J Biol Chem*, **278**, 40953-40958.

Montana, V., Farkas, D.L. & Loew, L.M. (1989) Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential. *Biochemistry*, **28**, 4536-4539.

Moreno, M.R., Pascual, R. & Villalain, J. (2004) Identification of membrane-active regions of the HIV-1 envelope glycoprotein gp41 using a 15-mer gp41-peptide scan. *Biochim Biophys Acta*, **1661**, 97-105.

Munoz-Barroso, I., Salzwedel, K., Hunter, E. & Blumenthal, R. (1999) Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J Virol*, **73**, 6089-6092.

Narayanan, K., Maeda, A., Maeda, J. & Makino, S. (2000) Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J Virol*, **74**, 8127-8134.

Nelson, D. & Cox, M. (2000) Lehninger Principles of Biochemistry. *Worth publishers, New York*, **3ed**.

- Neumann, N. & Snatzke, G. (1990) Circular dichroism of proteins. *Bradshaw, Proteins: Form and function*, 107-117.
- New, R. (1990) Liposomes, a practical approach. *IRL Press, Oxford*.
- Nguyen, V.P. & Hogue, B.G. (1997) Protein interactions during coronavirus assembly. *J Virol*, **71**, 9278-9284.
- Nieva, J.L., Alonso, A., Basanez, G., Goni, F.M., Gulik, A., Vargas, R. & Luzzati, V. (1995) Topological properties of two cubic phases of a phospholipid:cholesterol:diacylglycerol aqueous system and their possible implications in the phospholipase C-induced liposome fusion. *FEBS Lett*, **368**, 143-147.
- Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P. & Slotte, J.P. (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res*, **41**, 66-97.
- Oostra, M., de Haan, C.A. & Rottier, P.J. (2007) The 29-nucleotide deletion present in human but not in animal severe acute respiratory syndrome coronaviruses disrupts the functional expression of open reading frame 8. *J Virol*, **81**, 13876-13888.
- Opstelten, D.J., Raamsman, M.J., Wolfs, K., Horzinek, M.C. & Rottier, P.J. (1995) Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J Cell Biol*, **131**, 339-349.
- Pascual, R., Moreno, M.R. & Villalain, J. (2005) A peptide pertaining to the loop segment of human immunodeficiency virus gp41 binds and interacts with model biomembranes: implications for the fusion mechanism. *J Virol*, **79**, 5142-5152.
- Pascher, I., Lundmark, M., Nyholm, P.G. & Sundell, S. (1992) Crystal structures of membrane lipids. *Biochim Biophys Acta*, **1113**, 339-373.
- Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B. & Zitzmann, N. (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6104-6108.
- Peisajovich, S.G., Epan, R.F., Pritsker, M., Shai, Y. & Epan, R.M. (2000a) The polar region consecutive to the HIV fusion peptide participates in membrane fusion. *Biochemistry*, **39**, 1826-1833.
- Peisajovich, S.G., Samuel, O. & Shai, Y. (2000b) Paramyxovirus F1 protein has two fusion peptides: implications for the mechanism of membrane fusion. *J Mol Biol*, **296**, 1353-1365.
- Pereira, F.B., Goni, F.M. & Nieva, J.L. (1995) Liposome destabilization induced by the HIV-1 fusion peptide effect of a single amino acid substitution. *FEBS Lett*, **362**, 243-246.
- Perez-Berna, A.J., Guillen, J., Moreno, M.R., Bernabeu, A., Pabst, G., Laggner, P. & Villalain, J. (2008) Identification of the membrane-active regions of HCV p7 protein. Biophysical characterization of the loop region. *J Biol Chem*.

VI. Bibliografía

Perez-Berna, A.J., Moreno, M.R., Guillen, J., Bernabeu, A. & Villalain, J. (2006) The membrane-active regions of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins. *Biochemistry*, **45**, 3755-3768.

Petit, C.M., Melancon, J.M., Chouljenko, V.N., Colgrove, R., Farzan, M., Knipe, D.M. & Kousoulas, K.G. (2005) Genetic analysis of the SARS-coronavirus spike glycoprotein functional domains involved in cell-surface expression and cell-to-cell fusion. *Virology*, **341**, 215-230.

Piller, S.C., Ewart, G.D., Premkumar, A., Cox, G.B. & Gage, P.W. (1996) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 111-115.

Pinheiro, T.J. & Watts, A. (1994a) Lipid specificity in the interaction of cytochrome c with anionic phospholipid bilayers revealed by solid-state ³¹P NMR. *Biochemistry*, **33**, 2451-2458.

Pinheiro, T.J. & Watts, A. (1994b) Resolution of individual lipids in mixed phospholipid membranes and specific lipid-cytochrome c interactions by magic-angle spinning solid-state phosphorus-31 NMR. *Biochemistry*, **33**, 2459-2467.

Pinto, L.H., Holsinger, L.J. & Lamb, R.A. (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, **69**, 517-528.

Premkumar, A., Wilson, L., Ewart, G.D. & Gage, P.W. (2004) Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett*, **557**, 99-103.

Ramstedt, B. & Slotte, J.P. (2002) Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett*, **531**, 33-37.

Rietveld, A.G., Killian, J.A., Dowhan, W. & de Kruijff, B. (1993) Polymorphic regulation of membrane phospholipid composition in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **268**, 12427-12433.

Robison, C.S. & Whitt, M.A. (2000) The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *J Virol*, **74**, 2239-2246.

Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F.A. & Gaudin, Y. (2006) Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science*, **313**, 187-191.

Roche, S., Rey, F.A., Gaudin, Y. & Bressanelli, S. (2007) Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science*, **315**, 843-848.

Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campagnoli, R., Icenogle, J.P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.D., Peret, T.C., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A.D.,

- Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J. & Bellini, W.J. (2003) Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, **300**, 1394-1399.
- Rottier, P., Armstrong, J. & Meyer, D.I. (1985) Signal recognition particle-dependent insertion of coronavirus E1, an intracellular membrane glycoprotein. *J Biol Chem*, **260**, 4648-4652.
- Routledge, E., Stauber, R., Pfeleiderer, M. & Siddell, S.G. (1991) Analysis of murine coronavirus surface glycoprotein functions by using monoclonal antibodies. *J Virol*, **65**, 254-262.
- Saez-Cirion, A., Gomara, M.J., Agirre, A. & Nieva, J.L. (2003) Pre-transmembrane sequence of Ebola glycoprotein. Interfacial hydrophobicity distribution and interaction with membranes. *FEBS Lett*, **533**, 47-53.
- Sainz, B., Jr., Rausch, J.M., Gallaher, W.R., Garry, R.F. & Wimley, W.C. (2005) Identification and characterization of the putative fusion peptide of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein. *J Virol*, **79**, 7195-7206.
- Salzwedel, K., West, J.T. & Hunter, E. (1999) A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J Virol*, **73**, 2469-2480.
- Santos, N.C., Prieto, M. & Castanho, M.A. (2003) Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochim Biophys Acta*, **1612**, 123-135.
- Schaecher, S.R., Mackenzie, J.M. & Pekosz, A. (2007) The ORF7b protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) is expressed in virus-infected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *J Virol*, **81**, 718-731.
- Schamberger, J. & Clarke, R.J. (2002) Hydrophobic ion hydration and the magnitude of the dipole potential. *Biophys J*, **82**, 3081-3088.
- Shen, S., Lin, P.S., Chao, Y.C., Zhang, A., Yang, X., Lim, S.G., Hong, W. & Tan, Y.J. (2005) The severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a is a novel structural protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **330**, 286-292.
- Siegel, D.P. (1993) Energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms. *Biophys J*, **65**, 2124-2140.
- Siegel, D.P. (1999) The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. *Biophys J*, **76**, 291-313.
- Simmons, G., Reeves, J.D., Rennekamp, A.J., Amberg, S.M., Piefer, A.J. & Bates, P. (2004) Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4240-4245.

VI. Bibliografía

Simons, K. & Vaz, W.L. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 269-295.

Singer, S.J. & Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.

Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W.J. & Gorbalenya, A.E. (2003) Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol*, **331**, 991-1004.

Stern, D.F. & Sefton, B.M. (1982) Coronavirus proteins: structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins. *J Virol*, **44**, 804-812.

Stohlman, S.A. & Lai, M.M. (1979) Phosphoproteins of murine hepatitis viruses. *J Virol*, **32**, 672-675.

Struck, D.K., Hoekstra, D. & Pagano, R.E. (1981) Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry*, **20**, 4093-4099.

Sturman, L.S., Holmes, K.V. & Behnke, J. (1980) Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J Virol*, **33**, 449-462.

Suarez, T., Gallaher, W.R., Agirre, A., Goni, F.M. & Nieva, J.L. (2000a) Membrane interface-interacting sequences within the ectodomain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: putative role during viral fusion. *J Virol*, **74**, 8038-8047.

Suarez, T., Nir, S., Goni, F.M., Saez-Cirion, A. & Nieva, J.L. (2000b) The pre-transmembrane region of the human immunodeficiency virus type-1 glycoprotein: a novel fusogenic sequence. *FEBS Lett*, **477**, 145-149.

Supekar, V.M., Bruckmann, C., Ingallinella, P., Bianchi, E., Pessi, A. & Carfi, A. (2004) Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17958-17963.

Surewicz, W.K., Mantsch, H.H. & Chapman, D. (1993) Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry*, **32**, 389-394.

Swift, A.M. & Machamer, C.E. (1991) A Golgi retention signal in a membrane-spanning domain of coronavirus E1 protein. *J Cell Biol*, **115**, 19-30.

Szoka, F., Jr. & Papahadjopoulos, D. (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng*, **9**, 467-508.

- Tahara, S.M., Dietlin, T.A., Nelson, G.W., Stohlman, S.A. & Manno, D.J. (1998) Mouse hepatitis virus nucleocapsid protein as a translational effector of viral mRNAs. *Adv Exp Med Biol*, **440**, 313-318.
- Tan, Y.J., Teng, E., Shen, S., Tan, T.H., Goh, P.Y., Fielding, B.C., Ooi, E.E., Tan, H.C., Lim, S.G. & Hong, W. (2004) A novel severe acute respiratory syndrome coronavirus protein, U274, is transported to the cell surface and undergoes endocytosis. *J Virol*, **78**, 6723-6734.
- Thiel, V., Ivanov, K.A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B., Sniijder, E.J., Rabenau, H., Doerr, H.W., Gorbalenya, A.E. & Ziebuhr, J. (2003) Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol*, **84**, 2305-2315.
- Timani, K.A., Liao, Q., Ye, L., Zeng, Y., Liu, J., Zheng, Y., Ye, L., Yang, X., Lingbao, K., Gao, J. & Zhu, Y. (2005) Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus. *Virus Res*, **114**, 23-34.
- To, K.F. & Lo, A.W. (2004) Exploring the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS): the tissue distribution of the coronavirus (SARS-CoV) and its putative receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). *J Pathol*, **203**, 740-743.
- Torii, H. & Tasumi, M. (1992) Model calculations on the amide-I infrared bands of globular proteins. *J Chem Phys*, **96**, 3379-3387.
- Triplet, B., Howard, M.W., Jobling, M., Holmes, R.K., Holmes, K.V. & Hodges, R.S. (2004) Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core. *J Biol Chem*, **279**, 20836-20849.
- Usher, J.R., Epand, R.M. & Papahadjopoulos, D. (1978) The effect of free fatty acids on the thermotropic phase transition of dimyristoyl glycerophosphocholine. *Chem Phys Lipids*, **22**, 245-253.
- Vennema, H., Godeke, G.J., Rossen, J.W., Voorhout, W.F., Horzinek, M.C., Opstelten, D.J. & Rottier, P.J. (1996) Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *Embo J*, **15**, 2020-2028.
- Venyaminov, S. & Kalnin, N.N. (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers*, **30**, 1243-1257.
- Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann, T.A. & Damjanovich, S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8053-8058.
- Villalain, J. (1996) Location of cholesterol in model membranes by magic-angle-sample-spinning NMR. *Eur J Biochem*, **241**, 586-593.

VI. Bibliografía

Wang, M., Jing, H.Q., Xu, H.F., Jiang, X.G., Kan, B., Liu, Q.Y., Wan, K.L., Cui, B.Y., Zheng, H., Cui, Z.G., Yan, M.Y., Liang, W.L., Wang, H.X., Qi, X.B., Li, Z.J., Li, M.C., Chen, K., Zhang, E.M., Zhang, S.Y., Hai, R., Yu, D.Z. & Xu, J.G. (2005a) [Surveillance on severe acute respiratory syndrome associated coronavirus in animals at a live animal market of Guangzhou in 2004]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, **26**, 84-87.

Wang, M., Yan, M., Xu, H., Liang, W., Kan, B., Zheng, B., Chen, H., Zheng, H., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Liu, Y.F., Guo, R.T., Liu, X.N., Zhan, L.H., Zhou, D.H., Zhao, A., Hai, R., Yu, D., Guan, Y. & Xu, J. (2005b) SARS-CoV infection in a restaurant from palm civet. *Emerg Infect Dis*, **11**, 1860-1865.

Wang, P., Chen, J., Zheng, A., Nie, Y., Shi, X., Wang, W., Wang, G., Luo, M., Liu, H., Tan, L., Song, X., Wang, Z., Yin, X., Qu, X., Wang, X., Qing, T., Ding, M. & Deng, H. (2004) Expression cloning of functional receptor used by SARS coronavirus. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 439-444.

Wang, Z.G., Xu, S.P. & Zhang, Y.J. (2006) The possible origin of recent human SARS coronavirus isolate from China. *Acta Virol*, **50**, 211-213.

Weissenhorn, W., Hinz, A. & Gaudin, Y. (2007) Virus membrane fusion. *FEBS Lett*.

White, S.H. & Wimley, W.C. (1998) Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochim Biophys Acta*, **1376**, 339-352.

Wilbur, S.M., Nelson, G.W., Lai, M.M., McMillan, M. & Stohlman, S.A. (1986) Phosphorylation of the mouse hepatitis virus nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **141**, 7-12.

Wilson, L., McKinlay, C., Gage, P. & Ewart, G. (2004) SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology*, **330**, 322-331.

Wong, S.K., Li, W., Moore, M.J., Choe, H. & Farzan, M. (2004) A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem*, **279**, 3197-3201.

Woody, R.W. (1995) Circular dichroism. *Methods Enzymol*, **246**, 34-71.

Wu, Q., Zhang, Y., Lu, H., Wang, J., He, X., Liu, Y., Ye, C., Lin, W., Hu, J., Ji, J., Xu, J., Ye, J., Hu, Y., Chen, W., Li, S., Wang, J., Wang, J., Bi, S. & Yang, H. (2003) The E protein is a multifunctional membrane protein of SARS-CoV. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **1**, 131-144.

Wu, X.D., Shang, B., Yang, R.F., Yu, H., Ma, Z.H., Shen, X., Ji, Y.Y., Lin, Y., Wu, Y.D., Lin, G.M., Tian, L., Gan, X.Q., Yang, S., Jiang, W.H., Dai, E.H., Wang, X.Y., Jiang, H.L., Xie, Y.H., Zhu, X.L., Pei, G., Li, L., Wu, J.R. & Sun, B. (2004) The spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) is cleaved in virus infected Vero-E6 cells. *Cell Res*, **14**, 400-406.

- Xiao, X., Chakraborti, S., Dimitrov, A.S., Gramatikoff, K. & Dimitrov, D.S. (2003) The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**, 1159-1164.
- Xiao, X., Feng, Y., Chakraborti, S. & Dimitrov, D.S. (2004) Oligomerization of the SARS-CoV S glycoprotein: dimerization of the N-terminus and trimerization of the ectodomain. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 93-99.
- Xu, Y., Zhu, J., Liu, Y., Lou, Z., Yuan, F., Liu, Y., Cole, D.K., Ni, L., Su, N., Qin, L., Li, X., Bai, Z., Bell, J.I., Pang, H., Tien, P., Gao, G.F. & Rao, Z. (2004) Characterization of the heptad repeat regions, HR1 and HR2, and design of a fusion core structure model of the spike protein from severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Biochemistry*, **43**, 14064-14071.
- Yang, H., Yang, M., Ding, Y., Liu, Y., Lou, Z., Zhou, Z., Sun, L., Mo, L., Ye, S., Pang, H., Gao, G.F., Anand, K., Bartlam, M., Hilgenfeld, R. & Rao, Z. (2003) The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13190-13195.
- Yang, Z.Y., Huang, Y., Ganesh, L., Leung, K., Kong, W.P., Schwartz, O., Subbarao, K. & Nabel, G.J. (2004) pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *J Virol*, **78**, 5642-5650.
- York, J. & Nunberg, J.H. (2004) Role of hydrophobic residues in the central ectodomain of gp41 in maintaining the association between human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein subunits gp120 and gp41. *J Virol*, **78**, 4921-4926.
- Yu, C.J., Chen, Y.C., Hsiao, C.H., Kuo, T.C., Chang, S.C., Lu, C.Y., Wei, W.C., Lee, C.H., Huang, L.M., Chang, M.F., Ho, H.N. & Lee, F.J. (2004) Identification of a novel protein 3a from severe acute respiratory syndrome coronavirus. *FEBS Lett*, **565**, 111-116.
- Yu, X., Bi, W., Weiss, S.R. & Leibowitz, J.L. (1994) Mouse hepatitis virus gene 5b protein is a new virion envelope protein. *Virology*, **202**, 1018-1023.
- Yuan, X., Li, J., Shan, Y., Yang, Z., Zhao, Z., Chen, B., Yao, Z., Dong, B., Wang, S., Chen, J. & Cong, Y. (2005) Subcellular localization and membrane association of SARS-CoV 3a protein. *Virus Res*, **109**, 191-202.
- Zampighi, G.A., Zampighi, L.M., Fain, N., Lanzavecchia, S., Simon, S.A. & Wright, E.M. (2006) Conical electron tomography of a chemical synapse: vesicles docked to the active zone are hemi-fused. *Biophys J*, **91**, 2910-2918.
- Zhong, N.S., Zheng, B.J., Li, Y.M., Poon, Xie, Z.H., Chan, K.H., Li, P.H., Tan, S.Y., Chang, Q., Xie, J.P., Liu, X.Q., Xu, J., Li, D.X., Yuen, K.Y., Peiris & Guan, Y. (2003) Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet*, **362**, 1353-1358.

VI. Bibliografía

Zhu, J., Xiao, G., Xu, Y., Yuan, F., Zheng, C., Liu, Y., Yan, H., Cole, D.K., Bell, J.I., Rao, Z., Tien, P. & Gao, G.F. (2004) Following the rule: formation of the 6-helix bundle of the fusion core from severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein and identification of potent peptide inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, **319**, 283-288.





Capítulo

VII

Publicaciones





Publicación

1

Identification of the membrane-active regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike membrane glycoprotein using a 16/18-mer peptide scan: implications for the viral fusion mechanism.

Jaime Guillén, Ana J. Pérez-Berná, Miguel R. Moreno, and José Villalaín

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad "Miguel Hernández", Elche-Alicante, Spain.

Journal of Virology, 2005, 79(3); 1743-1752.

Identification of the Membrane-Active Regions of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Membrane Glycoprotein Using a 16/18-Mer Peptide Scan: Implications for the Viral Fusion Mechanism

Jaime Guillén, Ana J. Pérez-Berná, Miguel R. Moreno, and José Villalain*

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad “Miguel Hernández”, Elche-Alicante, Spain

Received 30 June 2004/Accepted 16 September 2004

We have identified the membrane-active regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS CoV) spike glycoprotein by determining the effect on model membrane integrity of a 16/18-mer SARS CoV spike glycoprotein peptide library. By monitoring the effect of this peptide library on membrane leakage in model membranes, we have identified three regions on the SARS CoV spike glycoprotein with membrane-interacting capabilities: region 1, located immediately upstream of heptad repeat 1 (HR1) and suggested to be the fusion peptide; region 2, located between HR1 and HR2, which would be analogous to the loop domain of human immunodeficiency virus type 1; and region 3, which would correspond to the pretransmembrane region. The identification of these membrane-active regions, which are capable of modifying the biophysical properties of phospholipid membranes, supports their direct role in SARS CoV-mediated membrane fusion, as well as facilitating the future development of SARS CoV entry inhibitors.

An infectious disease, designated severe acute respiratory syndrome (SARS), broke out in China in late 2002 and quickly spread to several countries. The infectious agent responsible for this epidemic outbreak was identified as a previously unknown member of the family of coronaviruses (CoV), SARS CoV (10, 21, 30, 31). Its phylogenetic analysis showed that it was neither a mutant nor a recombinant of previously characterized CoV (35). These viruses are a diverse group of enveloped, positive-strand RNA viruses, with three or four proteins embedded in the envelope, that cause respiratory and enteric diseases in humans and other animals (10, 21, 30, 31). CoV infection, similarly to other envelope viruses, is achieved through fusion of the lipid bilayer of the viral envelope with the host cell membrane.

The fusion of viral and cellular membranes, the critical early events in viral infection, are mediated by envelope glycoproteins located on the outer surfaces of the viral membranes (11, 17). SARS CoV membrane fusion is mediated by the viral spike glycoprotein located on the viral envelope, which is synthesized as a 180-kDa precursor and displayed in ~200 copies on the viral membrane in a trimeric or dimeric structure (10, 21, 30, 35, 47). In some CoV strains, the spike glycoprotein is cleaved by a protease to yield two noncovalently associated subunits, S1 and S2 (Fig. 1A), which have different functions (16, 40). However, cleavage is not an absolute requirement for the mechanism of fusion, and the available data suggest that the SARS CoV spike glycoprotein is not cleaved into two subunits (9, 18, 35). S1, which forms the globular portion of the spike, contains the receptor-binding site and thus defines the host range of the virus (42), while S2, more conserved than S1,

forms the membrane-anchored stalk region and mediates the fusion between the viral and cellular membranes (35, 47).

S2 contains two predicted α -helical heptad repeat (HR) domains (HR1 and HR2) which form coiled-coil structures (5, 6, 20, 22, 35, 43, 50). These regions, separated by a stretch of 140 amino acid residues called the interhelical domain, are thought to play important roles in defining the oligomeric structure of the spike protein in its native state and its fusogenic ability (23). The presence of the HR regions, in conjunction with recent studies, indicates that CoV spike proteins can be classified as class 1 viral fusion proteins (5, 6, 20, 22, 43, 50). In the current paradigm of virus-host cell membrane fusion for class 1 viral fusion proteins, the HR domains form a six-helix bundle, where three HR1 helices fold into a central parallel triple-stranded α -helical coiled coil, and wrapped antiparallel HR2 α -helices, each HR1-HR2 pair connected by a loop that reverses the polypeptide chain (5, 15, 17, 20, 22, 43, 50). The HR1 and HR2 regions are believed to be important domains in this process and show different conformations in different fusion states (11, 49). Under the current model, there are at least three conformational states of the envelope fusion protein, the prefusion native state, the prehairpin intermediate state, and the postfusion hairpin state (11, 49). This trimeric helical hairpin structure is thought to form at a late stage during the membrane fusion process (15, 17). Formation of the six-helix coiled-coil bundle brings into close proximity the fusion peptide (FP) and the pretransmembrane (PTM) and transmembrane (TM) domains, thereby driving the viral and host cell membranes into close contact, making possible the formation of the fusion pore (11, 15, 17). In class 1 viral fusion proteins, the FP invariably occurs upstream of the HR1 region; however, no FP has been experimentally identified in any CoV spike protein, although a hydrophobic region has been predicted recently at the N terminus of the HR1 region (5).

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad “Miguel Hernández”, E-03202 Elche-Alicante, Spain. Phone: 34 966 658 762. Fax: 34 966 658 758. E-mail: villalain@umh.es.

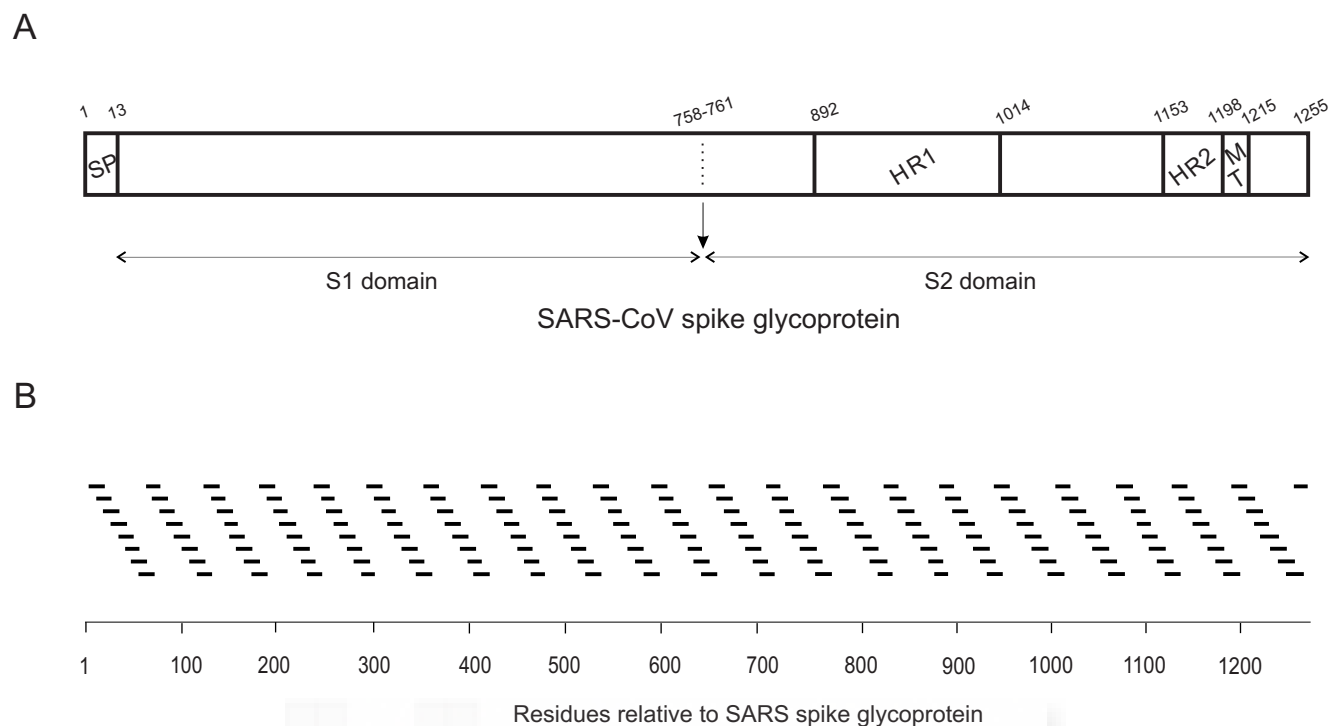


FIG. 1. (A) Scheme of the structure of SARS-CoV spike glycoprotein S (amino acid residues 1 to 1255 for the full length), as well as the S1 and S2 domains, according to literature consensus. Boundaries between the different domains cannot be accurately identified at present but are indicated for the convenience of comparison with other coronaviruses. The relevant functional regions are highlighted: the N-terminal signal peptide (SP), the transmembrane domain (TM) and the predicted heptad repeat regions pertaining to the S2 domain, HR1 and HR2. (B) Sequence of the 169 16/18-mer peptides used in this study with respect to the sequence of the whole spike glycoprotein S. Maximum overlap between adjacent peptides is 10 amino acids.

Although much information has been gathered in recent years, we do not yet know the exact mechanism of membrane fusion and the processes which are behind it. The mechanism by which proteins facilitate the formation of fusion intermediates is a complex process involving several segments of fusion proteins (15, 32). These regions, either directly or indirectly, might interact with biological membranes, contributing to the viral envelope and cell membrane merging. Even though the detailed structures of different segments of the SARS CoV spike glycoprotein have been elucidated, there are still many questions to be answered regarding its mode of action in accelerating membrane fusion. Moreover, SARS CoV entry is an attractive target for anti-SARS therapy. To investigate the structural basis of SARS CoV membrane fusion and identify new fusion inhibitors, we carried out the analysis of the different regions of the SARS CoV spike glycoprotein that might interact with phospholipid membranes, using an approach similar to that used for studying the human immunodeficiency virus (HIV) gp41 ectodomain (25), i.e., the identification of membrane-active regions of SARS CoV spike glycoprotein by determining the effect on membrane integrity of a 16/18-mer spike glycoprotein-derived peptide library. By monitoring the effect of this peptide library on membrane integrity, i.e., leakage, we have identified different regions on the SARS CoV spike glycoprotein with membrane-interacting capabilities, which supports their direct role in membrane fusion and therefore might help in understanding the molecular mechanism of

membrane merging, as well as making possible the future development of SARS entry inhibitors, which may lead to new vaccine strategies.

MATERIALS AND METHODS

Materials and reagents. Egg L- α -phosphatidylcholine (EPC), egg sphingomyelin (SM), and cholesterol (Chol), were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, Ala.). 5-Carboxyfluorescein (CF) (>95% by high-performance liquid chromatography) was from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). A set of 169 peptides 16 or 18 amino acids in length derived from the SARS spike glycoprotein, with 10-amino-acid overlap between sequential peptides, was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Md.). Porcine lungs were obtained from a local slaughterhouse. Plasma membranes from lung tissue pneumocytes were obtained according to the method of Müller et al. (26), and lipid extraction from porcine lungs was performed according to the procedure of Bligh and Dyer using a ratio of 1:1:0.9 (vol/vol/vol) between chloroform-methanol and the corresponding aqueous sample (4). All other reagents used were of analytical grade and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Water was deionized, distilled twice, and passed through a Milli-Q apparatus (Millipore Ibérica, Madrid, Spain) to a resistivity better than 18 M Ω /cm.

Sample preparation. Aliquots containing the appropriate amount of lipid in chloroform-methanol (2:1 [vol/vol]) were placed in a test tube, the solvents were removed by evaporation under a stream of O₂-free nitrogen, and finally, traces of solvents were eliminated under vacuum in the dark for >3 h. After that, 1 ml of buffer containing 10 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 7.4, and CF at a concentration of 40 mM was added, and multilamellar vesicles were obtained. Large unilamellar vesicles (LUV) with a mean diameter of 90 nm were prepared from multilamellar vesicles by the extrusion method (19), using polycarbonate filters with a pore size of 0.1 μ m (Nuclepore Corp., Cambridge, Calif.). Breakdown of the

vesicle membrane leads to leakage of the contents, i.e., CF fluorescence. Non-encapsulated CF was separated from the vesicle suspension through a Sephadex G-75 filtration column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) eluted with buffer containing 10 mM Tris–0.1 M NaCl–1 mM EDTA, pH 7.4.

Leakage measurement. Leakage of intraliposomal CF was assayed by treating the probe-loaded liposomes (final lipid concentration, 0.125 mM) with the appropriate amounts of peptide on microtiter plates using a microplate reader (FLUOstar; BMG Labtech, Offenburg, Germany), each well containing a final volume of 170 μ l stabilized at 25°C. The medium in the microtiter plates was continuously stirred to allow the rapid mixing of peptide and vesicles. Leakage was measured at approximate peptide-to-lipid ratios of 1:15, 1:10, and 1:5. Changes in fluorescence intensity were recorded with excitation and emission wavelengths set at 492 and 517 nm, respectively. One hundred percent release was achieved by adding Triton X-100 to the microtiter plates to a final concentration of 0.5% (wt/wt). Fluorescence measurements were made initially with probe-loaded liposomes, then by adding peptide solution, and finally by adding Triton X-100 to obtain 100% leakage. Leakage was quantified on a percentage basis according to the following equation: % release = $(F_f - F_0)/(F_{100} - F_0) \times 100$, where F_f is the equilibrium value of fluorescence after peptide addition, F_0 is the initial fluorescence of the vesicle suspension, and F_{100} is the fluorescence value after the addition of Triton X-100. The phospholipid concentration was measured by methods described previously (7).

Hydrophobic moments, hydrophobicity, and interfaciality. The hydrophobic-moment calculations were carried out according to the method of Eisenberg et al. (12, 13), and the scale for calculating hydrophobic moments was taken from Engelman et al. (14). Hydrophobicity and interfacial values, i.e., whole residue scales for the transfer of an amino acid of an unfolded chain into the membrane hydrocarbon palisade and the membrane interface, respectively, were obtained from http://blanco.biomol.uci.edu/hydrophobicity_scales.html (45, 46). Two-dimensional plots of the hydrophobic moments, hydrophobicity, and interfaciality were obtained using a window of seven amino acids, taking into consideration the arrangement of the amino acids in the space and assuming an α -helical structure (see Fig. 5). Each specific value in the two-dimensional plot represents the mean of the values pertaining to the hydrophobic moment, hydrophobicity, and interfaciality of the amino acid at that position and its neighbors. Positive values correspond to positive bilayer-to-water transfer free-energy values, and therefore, the higher the value, the greater the probability to interact with the membrane surface and/or the hydrophobic core (45, 46).

RESULTS

The SARS CoV spike glycoprotein consists of an extracellular domain, a TM domain, and an intracellular domain (Fig. 1A), and it can be classified as a class I viral fusion protein (5, 6, 20, 22, 43, 50). Although it was previously thought that the FP of class I proteins was the only factor responsible for the cell membrane interaction leading to membrane fusion, it has been shown recently that, apart from the FP, other regions of viral fusion proteins bind and interact with membranes and experience conformational changes which all combine to make possible the fusion of the viral and cell membranes (8, 15, 25, 32). To explore the structural basis of SARS CoV membrane fusion, we have carried out the analysis of the different regions of the full SARS CoV spike glycoprotein that might interact with phospholipid membranes by using a peptide library derived from the SARS CoV spike glycoprotein. This peptide library was composed of 169 peptides 16 and 18 amino acids in length, and by using an approach similar to that used for studying the HIV gp41 ectodomain (25), we studied their effects on the release of an encapsulated fluorophore, CF, using the experimental setup described in Materials and Methods. The 169 peptides we used in this study and their correlation with the SARS CoV spike glycoprotein sequence are shown in Fig. 1B. As can be observed, the 16/18-mer peptide library encompasses the whole sequence of the SARS CoV spike glycoprotein, i.e., from the signal peptide to the sequence that

follows the TM domain, including the recently identified HR1 and HR2 domains.

The S1 domain of the SARS CoV spike glycoprotein forms the globular portion of the spike and mediates binding to the host cells (16, 40, 42), being the receptor-binding domain localized in the amino acid sequence 318 to 510 (9, 47). Although the proposed role for the S1 domain is the attachment of the protein to its functional receptor, angiotensin-converting enzyme 2, several hydrophobic patches have been identified, which might be important not only for protein-protein binding but also for membrane interaction, since, as was mentioned above, S1 probably remains covalently attached to the S2 domain during the fusion process (9, 34, 35, 47). Figure 2A and B shows the effect of the S1 domain-derived 16/18-mer peptides on membrane integrity, i.e., leakage, at different peptide-to-lipid ratios and two different liposome compositions, namely, EPC-SM-Chol at a molar ratio of 70:15:15 and EPC-Chol at a molar ratio of 5:1. For liposomes composed of EPC-SM-Chol (Fig. 2A), it is clearly evident that some peptides exerted hardly any effect, but other peptides showed notable effects on liposome leakage in comparison. The most notable effects were observed for peptides 34 and 85, which produced leakage of \sim 33 and 22%, respectively, at the highest peptide-to-lipid ratio used. Similar to what was found for EPC-SM-Chol liposomes, the same peptides, i.e., peptides 34 and 85, were the ones which interacted with liposomes composed of EPC-Chol (Fig. 2B). For EPC-Chol liposomes, the leakage values for peptides 34 and 85 were \sim 22 and 10%, i.e., slightly lower than those found for EPC-SM-Chol liposomes. The other peptides from the S1 domain, apart from peptides 34 and 85, exerted no significant effect on liposome leakage.

In order to compare leakage values obtained in phospholipid model membranes with those obtained in biologically derived model membranes, we also studied liposome leakage produced by peptides derived from the S1 domain of the SARS CoV spike glycoprotein in model membranes whose lipids were obtained from a lipidic extract of lung tissue pneumocytes (Fig. 2C). It can be observed that the extent of leakage was slightly reduced compared to the EPC-SM-Chol and EPC-Chol liposome systems mentioned above. However, patterns of leakage similar to those described above can be discerned, since peptides 34 and 85 again showed relatively high leakage values compared to the leakage values exhibited by the other peptides pertaining to the S1 domain. It is worth noting that, for this liposome composition, peptide 50 also showed a similar leakage value.

We studied the interaction of the 16/18-mer S2 spike glycoprotein library with LUV model membranes having variable Chol and SM compositions, namely, EPC-SM-Chol at molar ratios of 70:15:15, 52:18:30, and 37:18:45 (Fig. 3A, B, and C, respectively). These model membranes, showing the coexistence of liquid-ordered and liquid-disordered phases, have a high probability of raft formation (2); as has been documented, the presence of laterally segregated membrane microdomains or lipid rafts is important for membrane fusion (1, 3, 28, 33, 37, 38, 44). For liposomes composed of EPC-SM-Chol at a molar ratio of 70:15:15 (Fig. 3A), it can be clearly observed that, whereas the vast majority of peptides exerted hardly any effect on membrane leakage, peptide 162 showed a dramatic effect, i.e., ca. 100% leakage for peptide (compare the ordinate scales

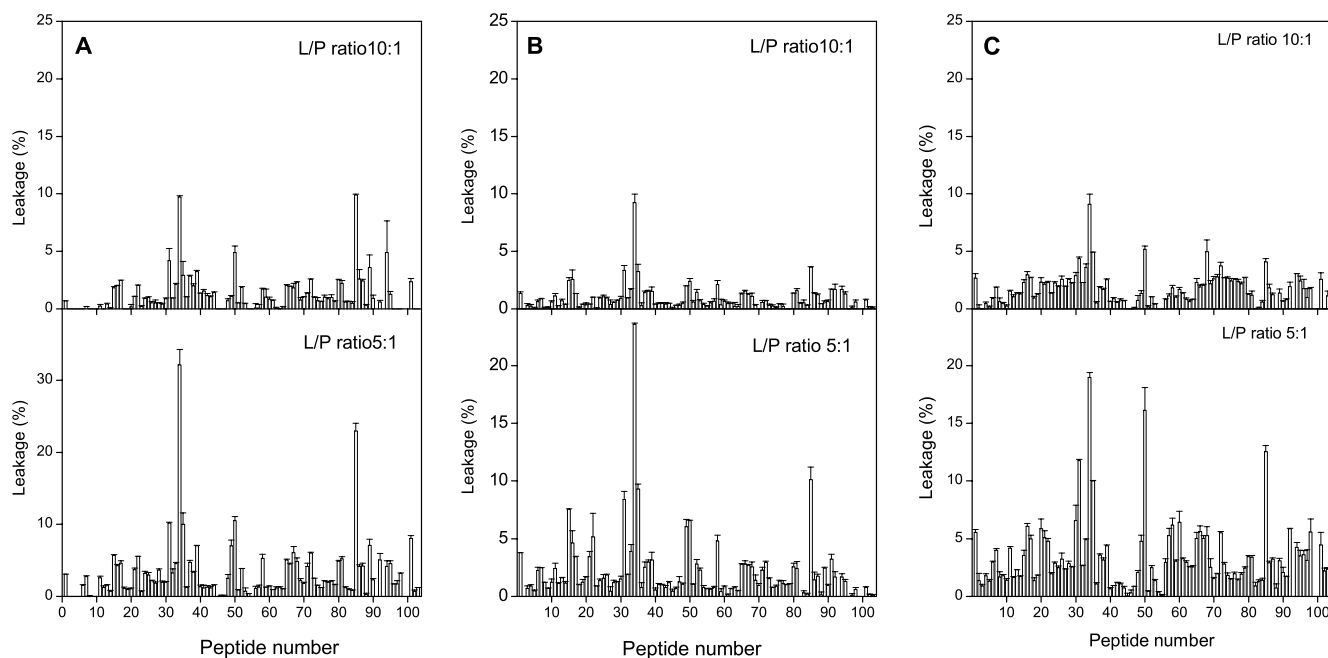


FIG. 2. Effects of the S1 domain derived 16/18-mer peptides on the release of LUV contents for different lipid compositions. Leakage data for LUV composed of (A) EPC-SM-Chol at a phospholipid molar ratio of 70:15:15, (B) EPC-Chol at a phospholipid molar ratio of 5:1, and (C) a lipidic extract of lung tissue pneumocytes at different peptide (P)-to-lipid (L) ratios as indicated. Experimental conditions are described in the text. The error bars indicate standard deviations of the mean for quadruplicate samples.

of Fig. 3A with those in Fig. 2). Other peptides that showed a significant effect, although not as high as peptide 162, were peptide 163 and, to a lesser extent, peptides 113, 123, 147, and 148. It is worth noting that peptide 163 did have a significant effect, not as great as that of peptide 162 but higher than the leakage values observed for peptides 113, 123, 147, and 148 (Fig. 3A). Similar to what was found for liposomes containing EPC-SM-Chol at a molar ratio of 70:15:15, some peptides interacted with liposomes composed of EPC-SM-Chol at molar ratios of 52:18:30 and 37:18:45 (Fig. 3B and C). The most notable effects were again observed for peptides 162 and 163, the former presenting the higher leakage values. However, the leakage values were reduced compared to those observed for liposomes containing EPC-SM-Chol at a molar ratio of 70:15:15. The major difference in the compositions of these liposomes is the PC-Chol ratio. In EPC-SM-Chol at molar ratios of 70:15:15, 52:18:30, and 37:18:45, the proportion of SM remains the same, whereas the PC-Chol ratio decreases, i.e., leakage values decrease as Chol contents increase. When liposomes composed of PC-SM at a molar ratio of 5:1 were studied, peptides 162 and 163 were again the ones which presented the most significant extents of leakage (Fig. 3D). Similar results were obtained for liposomes composed of PC-Chol at a molar ratio of 5:1 (Fig. 3E). Other peptides that showed positive leakage values, although not as significant as peptides 162 and 163, were peptides 113, 123, 147, and 148, similar to what was found earlier. However, it is interesting that EPC-Chol liposomes presented a lower extent of leakage than EPC-SM liposomes, stressing the fact that, as mentioned above, the Chol content might be responsible for the lower extent of leakage rather than the presence of both SM and Chol.

We also studied the effects of different lipid-to-peptide ra-

tios on leakage for liposomes composed of EPC-SM-Chol at a phospholipid molar ratio of 70:15:15 (Fig. 4A). It is clearly evident that peptide 162 was again the one which showed a dramatic effect, since nearly complete rupture of the liposomes was observed (ca. 100% leakage for peptide) at all lipid-to-peptide ratios tested. It is worth noting that, even at the lowest lipid-to-peptide ratio used, peptide 163 was the only one, apart from peptide 162, that had a relatively significant effect, although not as great as that of peptide 162 (Fig. 4A). As described above, other peptides that showed positive leakage values, although not as significant as peptide 162 or even peptide 163, were peptides 113, 123, 147, and 148.

In order to compare leakage values observed in model membranes with those obtained in biologically derived model membranes, we studied liposome leakage produced by peptides derived from the S2 domain in model membranes whose lipids were obtained from a lipidic extract of lung tissue pneumocytes at different lipid-to-peptide ratios (Fig. 4B); note the increase in leakage scale compared with Fig. 4A). It can be observed that the extent of leakage was greatly reduced compared to the model systems studied before. However, two patterns of leakage can be discerned, i.e., regions defined by peptide 119 and by peptides 162 and 163 (Fig. 4B).

DISCUSSION

Recent studies point out that CoV spike envelope glycoproteins can be classified as class I viral fusion proteins, and functional and biochemical analyses of the SARS CoV spike glycoprotein show that SARS CoV uses a membrane fusion mechanism that is similar to that of class I viral fusion proteins (5, 6, 20, 22, 43, 50). The SARS CoV spike glycoprotein con-

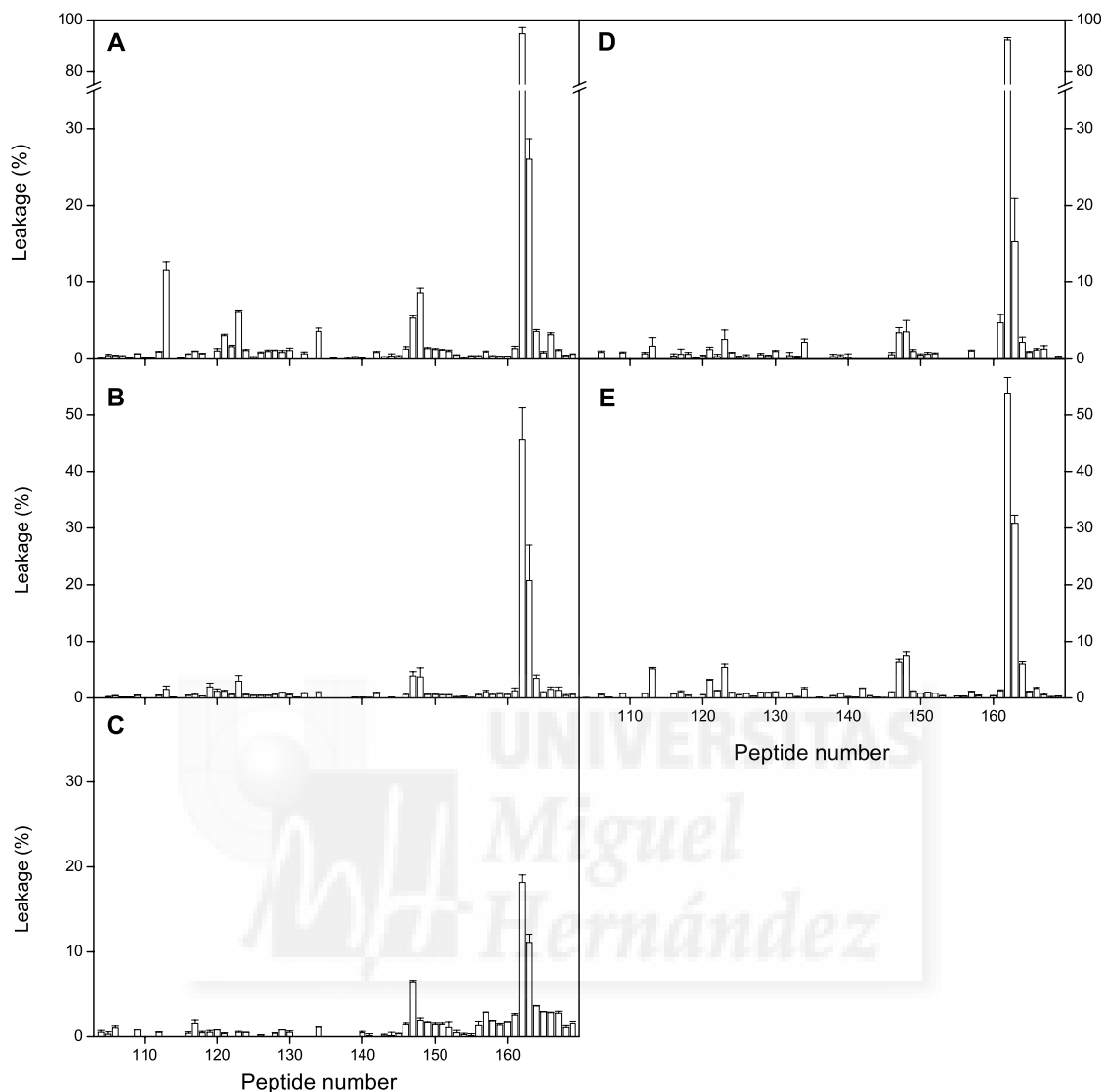


FIG. 3. Effects of the S2 domain-derived 16/18-mer peptides on the release of LUV contents for different lipid compositions at a peptide-to-lipid ratio of 1:15. Leakage data for LUV composed of (A) EPC-SM-Chol at a molar ratio of 70:15:15, (B) EPC-SM-Chol at a molar ratio of 52:18:30, (C) EPC-SM-Chol at a molar ratio of 37:18:45, (D) EPC-SM at a molar ratio of 5:1, and (E) EPC-Chol at a molar ratio of 5:1. The error bars indicate standard deviations of the mean of quadruplicate samples.

sists of an extracellular domain, a TM domain, and an intracellular domain (Fig. 1A). SARS CoV spike glycoprotein does not contain a typical proteolytic cleavage site, and the boundary between the S1 and S2 domains cannot be accurately identified at present (22). In addition, the available data suggest that the SARS CoV spike glycoprotein is not cleaved into two subunits, so most likely the S1 and S2 domains remain covalently bonded during the fusion process (9, 35). A signal peptide at the amino terminus has been recognized, and analogous to other class I viral fusion proteins, two α -helical heptad repeat domains, HR1 and HR2, have been identified (Fig. 1A). Although no obvious fusogenic peptide sequence has been experimentally identified, it is clear that viral and cellular membrane fusion is mediated by an internal FP in the SARS CoV spike glycoprotein. Nevertheless, a hydrophobic region

located upstream of the HR1 region has been recently predicted to be the FP (5).

Several lines of evidence indicate that, in addition to classical FPs, different regions of viral envelope glycoproteins are essential for membrane fusion to occur. In the case of the HIV type 1 (HIV-1) gp41 ectodomain, we have recently shown that, apart from the FP, three different regions of this protein, namely the 15- to 20-residue peptide segment that follows the FP at the N terminus, the immunodominant loop, and the 10- to 15-residue peptide segment that precedes the TM domain at the C terminus, i.e., the PTM domain, are capable of modifying the biophysical properties of phospholipid membranes, suggesting a direct role in membrane fusion (25). In the case of the SARS CoV spike glycoprotein, both the S1 and S2 subunits probably remain attached to each other during the fusion pro-

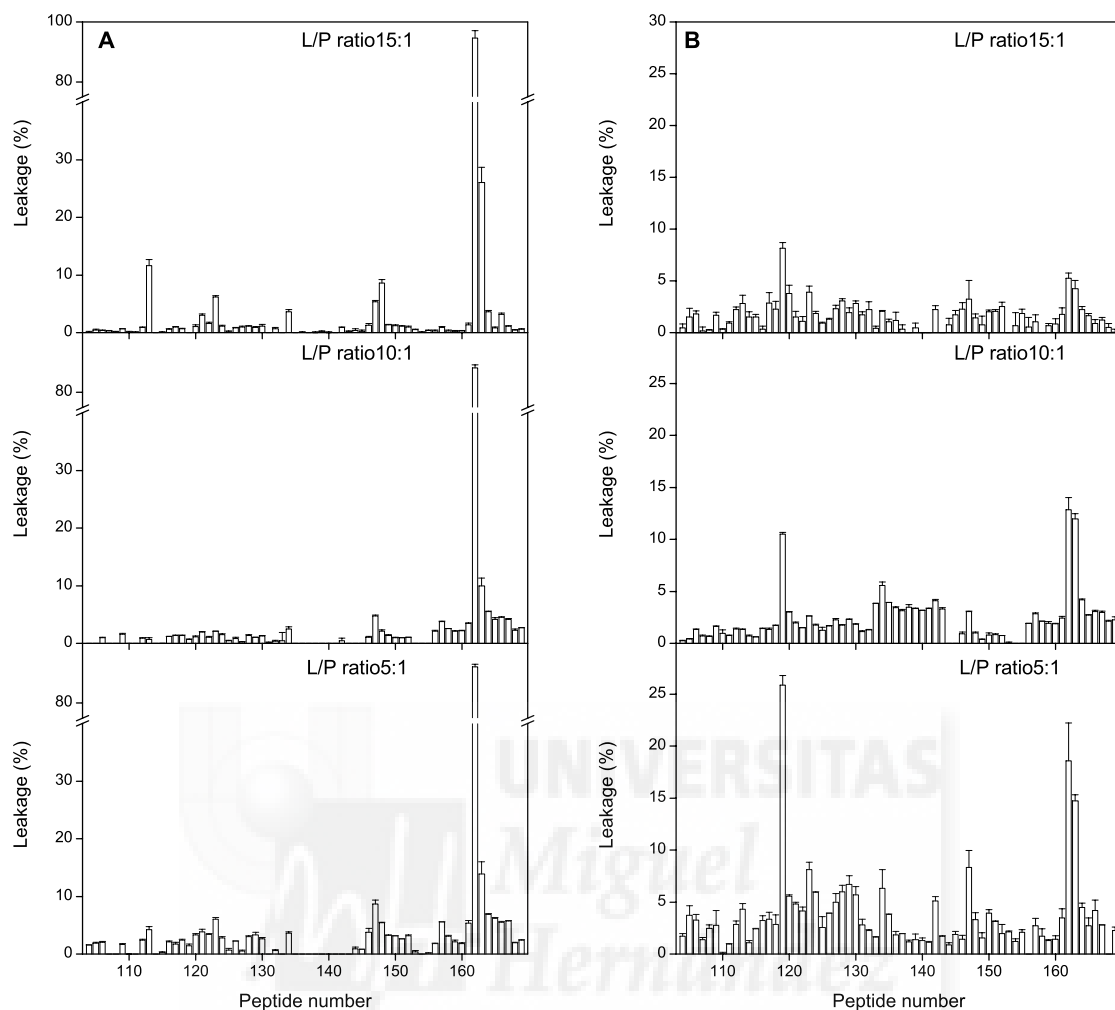


FIG. 4. Effects of the S2 domain-derived 16/18-mer peptides on the release of LUV contents for (A) EPC-SM-Chol at a phospholipid-molar ratio of 70:15:15 and (B) lipidic extract of lung tissue pneumocytes at different peptide (P)-to-lipid (L) ratios as indicated. The error bars indicate standard deviations of the mean for quadruplicate samples.

cess; however, the most probable role for the S1 subunit is the attachment to its specific receptor, whereas the S2 subunit is responsible for the fusion between the viral and cellular membranes (35, 47). As mentioned above, peptides 34, 50, and 85, which belong to the S1 domain, showed relatively significant membranotropic activity (Fig. 2). Similar to the HIV gp120 inner-domain regions interacting with gp41 (48), the regions of the S1 subunit where these peptides reside could associate with the S2 domain by specific hydrophobic interactions before the S1 subunit itself interacts with its receptors. As described above, these hydrophobic patches might be important not only for protein-protein binding but also for membrane interaction, since S1 probably remains covalently attached to the S2 domain during the fusion process. In fact, we have found that several peptides derived from the HIV gp120 region suggested to associate with its receptors have a significant effect on membrane leakage (unpublished data).

Hydrophobic moments measure the periodicity of residue distribution along a secondary-structure element (12, 13). The preferential orientation of the hydrophobic moments toward

one face of that element (Fig. 5, top) has been proposed to favor hydrophobic interactions between proteins and/or between proteins and membranes. In order to detect surfaces along the S2 domain of the SARS CoV spike glycoprotein that might be identified as membrane-partitioning and/or membrane-interacting zones, we plotted the average surface hydrophobic moments, hydrophobicity, and interfaciality versus the S2 domain amino acid sequence, assuming it adopts an α -helical structure along the whole sequence (Fig. 5, bottom). It is readily evident that there are three different regions with high positive values covering the surface of the helix and along it: one of these regions is located immediately upstream of the HR1 region (region 1 [R1]), another one is located between the heptad repeats HR1 and HR2 (R2), and the last is located at the end of the S2 domain sequence (R3). The last region partially matches the proposed TM domain of the spike glycoprotein. These regions, having positive bilayer-to-water transfer free-energy values, might show a tendency to partition into and interact with membrane surfaces or proteins. The adoption of a specific conformation can generate rich hydro-

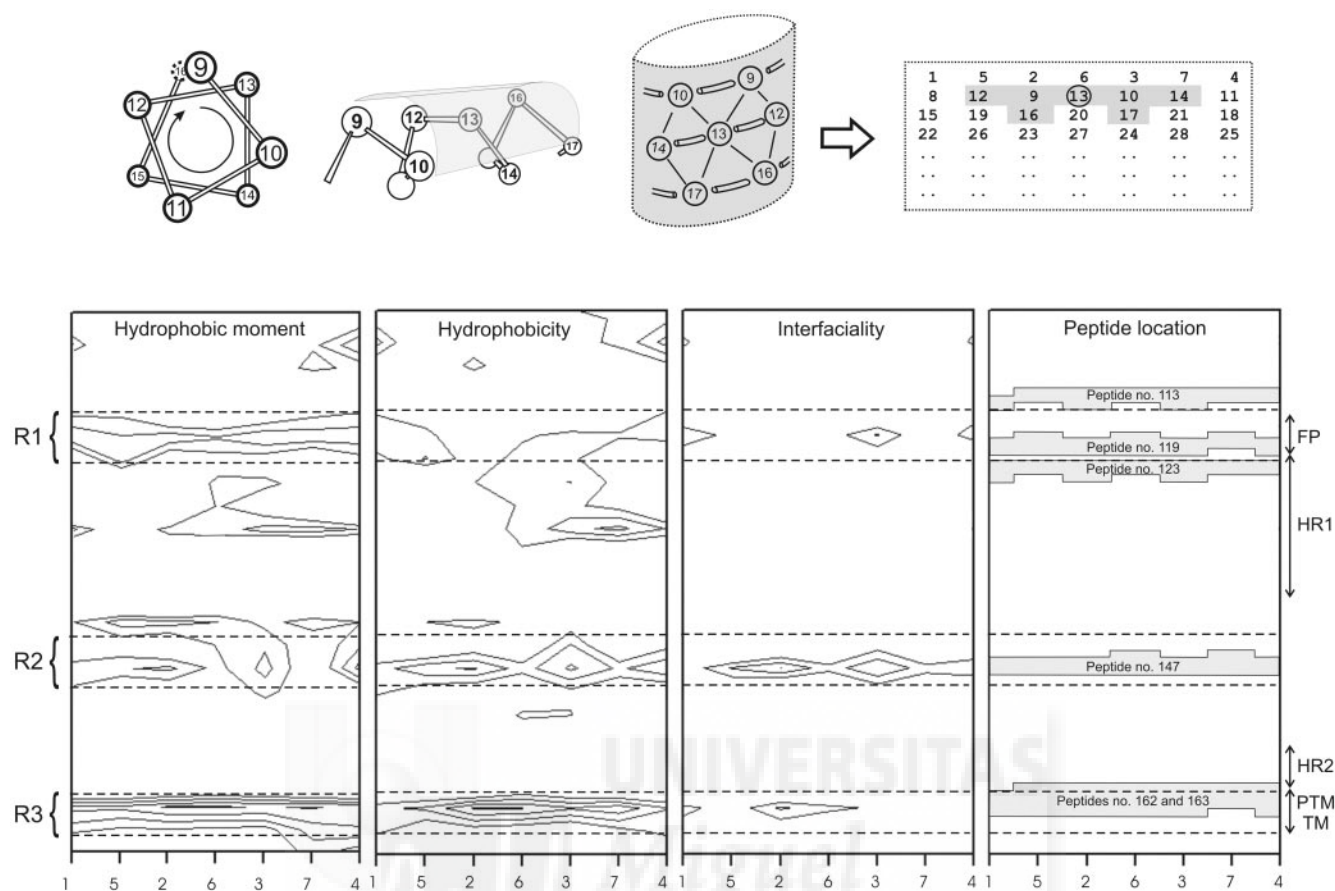


FIG. 5. (Top) Helical-wheel diagram indicating the amino acids which lie on the surface of a helix and their representation on a two-dimensional array to identify an amino acid position as a surface-interacting point. Each value in the two-dimensional plot represents the mean of the values pertaining to the hydrophobic moment, hydrophobicity, and interfaciality of the amino acid at that position plus those of its neighbors (window, seven amino acids). (Bottom) Hydrophobic moment, hydrophobicity, interfaciality distribution, and relative positions of peptides 113, 119, 123, 147, 162, and 163 along the SARS CoV spike S2 domain, assuming it forms an α -helical wheel, as shown above, and its correlation with the S2 different functional regions. Only positive bilayer-to-water transfer free-energy values are depicted (solid lines). The dashed lines identify three different domains (R1 to R3) with highly positive values along the helix. The suggested FP, heptad repeats HR1 and HR2, and the PTM and TM domains are indicated (see the text for details). Column numbers define amino acid positions as in the diagram above, upper row.

phobic surfaces along the structure and emphasize that the actual distribution of hydrophobicity and interfaciality, i.e., structure-related factors, along the S2 domain sequence might affect the biological function of these sequences (36).

As mentioned above, peptides 113, 119, 123, 147, and 162-163 were the peptides that exerted the most significant effect on model membranes, with peptide 162 the one that showed the most dramatic effects, since nearly 100% leakage was observed in many of the different compositions studied (Fig. 3 and 4). The extents of leakage observed for the other peptides were not as high as for peptide 162, but they were significantly higher than for the rest of the S2-derived peptides tested. Interestingly, peptide 119 showed the most important effect on pneumocyte-derived model membranes. We do not know the lipid compositions of these model membranes, but they must be very complex; nevertheless, two regions, defined by peptides 119 and 162-163, can be discerned (three if we count peptide 147 [Fig. 4B]). Actually, some peptides that are very active in model membrane systems are much less active in the biological membrane system, and the contrary is also true. However, it should be noted that membrane

systems having different lipid compositions have diverse properties which make them behave in significantly different ways (24). What is outstanding is that peptides 113 (ARDLICAQKFNGL TVL⁸²⁸⁻⁸⁴³) and 123 (VLYENQKQIANQFNKAI⁸⁹⁷⁻⁹¹³) are located at the boundaries of R1, peptide 119 (GAALQIPFAMQM AYRF⁸⁷³⁻⁸⁸⁸) is located inside R1, peptide 147 (FVFNGTSWFI TQRNFF¹⁰⁷⁷⁻¹⁰⁹²) is located inside R2, and peptides 162 and 163 (LGKYEQYIKWPWYVWLG¹¹⁸⁵⁻¹²⁰² and KWPWYVWLG FIAGLIAIV¹¹⁹³⁻¹²¹⁰) are located inside R3; all these regions represent surfaces with high bilayer-to-water transfer free-energy values (Fig. 5, bottom).

As mentioned above, the FP, a stretch of hydrophobic amino acids, is an essential factor in viral fusion proteins; however, it has not been identified, although it was recently predicted that the sequence comprising residues 858 to 886 from the S2 domain of the SARS CoV spike glycoprotein is indeed the FP domain (5). Peptide 119, which has a significant experimental membranotropic effect, as shown here, belongs to R1, as depicted in Fig. 5, bottom, and comprises residues 873 to 888 of the S2 domain of the SARS CoV spike glycoprotein. Since this

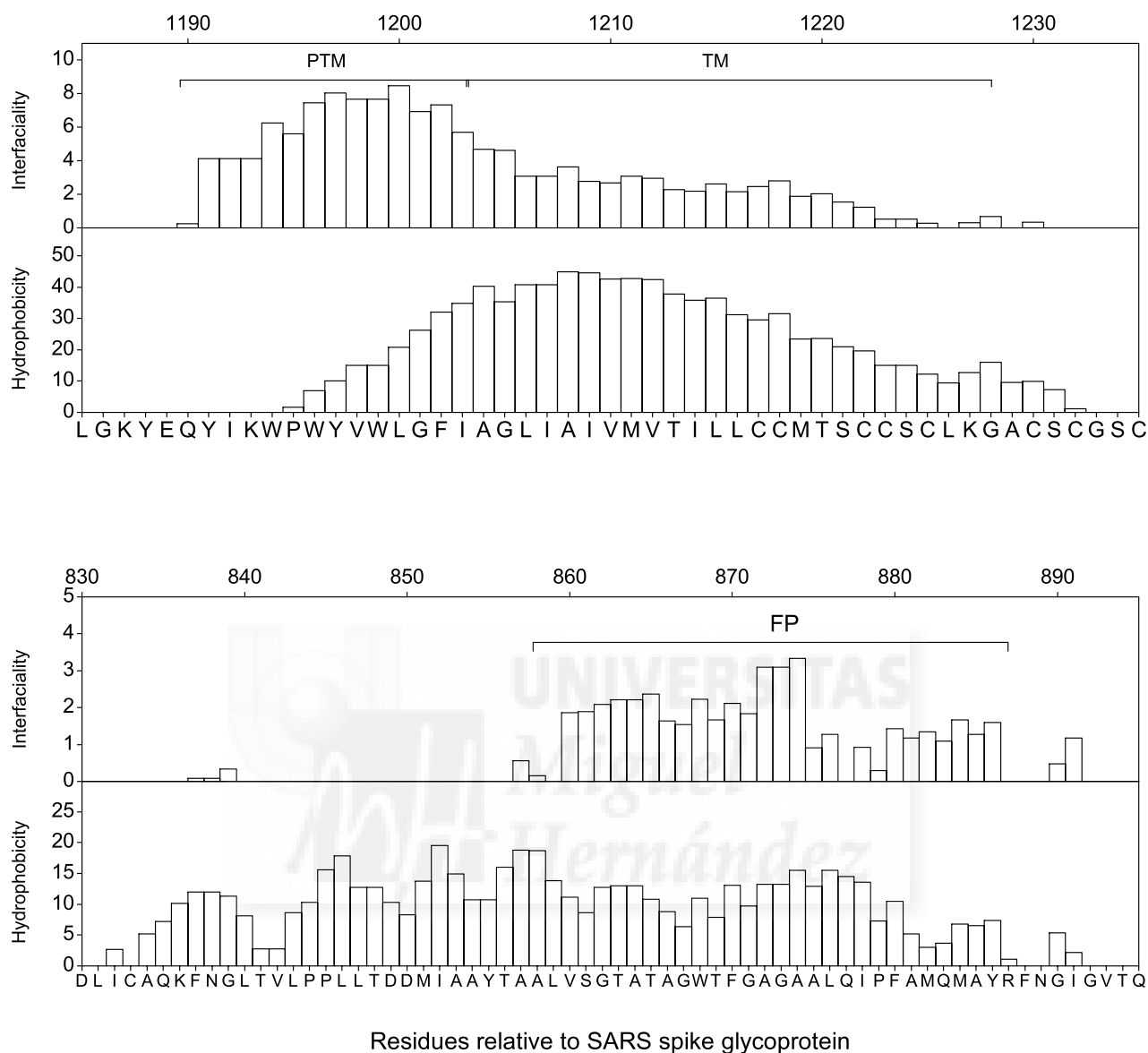


FIG. 6. Analysis of the interfacial and hydrophobic distribution using a window of 15 amino acids according to the scales of Wimley and White (46) along the proposed FP, PTM, and TM sequences of the SARS CoV spike glycoprotein S2 domain. Values above the 0 level correspond to positive bilayer-to-water transfer free-energy values.

peptide overlaps the theoretically predicted FP sequence 858 to 886 (5), the sequence is therefore a candidate to be the FP domain of the SARS CoV spike glycoprotein. Inspection of the sequence where this peptide is located reveals that it has a high content of alanine and glycine, characteristic of viral fusion peptides (15), and a high degree of interfaciality and hydrophobicity, essential properties for membrane-interacting sequences in proteins (Fig. 6). Its location immediately upstream of HR1, as found for other class I viral fusion proteins, is appropriate, since the formation of the six-helix coiled-coil bundle would bring into close proximity the FP and the PTM and TM domains (11, 15, 17).

Another fundamental structural and functional sequence for a class I viral fusion mechanism is the PTM, and one of the

most thoroughly studied PTM sequences is that belonging to HIV-1 gp41 (27, 39, 41). The PTM is a region immediately adjacent to the membrane-spanning domain of class I fusion proteins containing highly conserved hydrophobic residues and unusually rich in tryptophan residues. In addition, the PTM domain of HIV-1 gp41 shows a significant tendency to partition into membranes and is highly fusogenic (41). Peptides 162 and 163 from the SARS CoV S2 domain exert a dramatic effect on leakage for different model membranes (Fig. 3 and 4), and a careful inspection of the sequences reveals that they have characteristics similar to those of the PTM domain of HIV-1 gp41, notably, high tryptophan content and an interfacial stretch immediately following a hydrophobic one (Fig. 6). It is likely, then, that peptides 162 and 163 comprise the PTM

domain of the SARS CoV spike glycoprotein S2 subunit and, similar to the PTM domain of HIV-1 gp41, this sequence of the SARS CoV S2 subunit might be involved in the promotion of the membrane destabilization required for fusion, as well as in fusion pore formation and enlargement (32, 36).

Not only are the FP and PTM domains of HIV-1 gp41 essential for the perturbation of the membrane, but also, other regions of the protein interact and destabilize the viral and host membranes; this is what has been suggested for the HIV-1 gp41 immunodominant loop, which could play an essential role in the viral fusion process (8, 25, 29). One of the main characteristics of the gp41 loop domain, located between the HR1 and HR2 regions and instrumental in the formation of the gp41 central parallel triple-stranded α -helical coiled coil, is its tendency to partition into and interact with membrane surfaces (8, 25, 29). We have found a highly hydrophobic and interfacial domain flanked by SARS CoV HR1 and HR2 domains (R2) (Fig. 5, bottom), and remarkably, peptide 147, which has shown a notable leakage effect, is located in it. Therefore, R2 could play a role similar to that of the HIV-1 gp41 loop domain, i.e., destabilization of both viral and cellular membranes, favoring the formation of the fusion pore as well as its stabilization and therefore facilitating, along with the other regions, membrane fusion.

In conclusion, our results demonstrate that peptides originating from three different regions of the SARS CoV spike glycoprotein (Fig. 5, bottom)—R1, which corresponds to the 15- to 20-residue peptide segment immediately upstream of HR1; R2, which corresponds to a sequence between HR1 and HR2; and R3, which corresponds to the 10- to 15-residue peptide segment that immediately precedes the TM domain at the C terminus—are capable of modifying the biophysical properties of phospholipid membranes, a property which could provide an additional driving force for the merging of the viral and target cell membranes, suggesting that they have a direct role in SARS CoV-mediated membrane fusion and therefore might be necessary for assistance and enhancement of the viral and cell fusion process. These results should also facilitate the development of SARS CoV entry inhibitors, which might lead to new vaccine strategies, an important focus for clinical intervention.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant BMC2002-00158 from MCYT, Madrid, Spain (J.V.). M. R. Moreno and A. J. Pérez-Berná are recipients of predoctoral fellowships from Ministerio de Educación y Ciencia and Generalidad Valenciana, Spain, respectively.

We are especially grateful to Maite Garzón for her excellent assistance, as well as to the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program for making available the peptides used in this work.

REFERENCES

- Alfsen, A., and M. Bomsel. 2002. HIV-1 gp41 envelope residues 650–685 exposed on native virus acts as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J. Biol. Chem.* **277**:25649–25659.
- Almeida, R. F., A. Fedorov, and M. Prieto. 2003. Sphingomyelin-phosphatidylcholine-cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys. J.* **85**:2406–2416.
- Ahn, A., D. L. Gibbons, and M. Kielian. 2002. The fusion peptide of Semliki Forest virus associates with sterol-rich membrane domain. *J. Virol.* **76**:3267–3275.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **3**:911–917.
- Bosch, B. J., B. E. Martina, R. Van Der Zee, J. Lepault, B. J. Haijema, C. Verluis, A. J. Heck, R. De Groot, A. D. Osterhaus, and P. J. Rottier. 2004. Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:8455–8460.
- Bosch, B. J., R. van der Zee, C. A. de Haan, and P. J. Rottier. 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J. Virol.* **77**:8801–8811.
- Böttcher, C. S. F., C. M. Van Gent, and C. Fries. 1961. A rapid and sensitive submicro phosphorous determination. *Anal. Chim. Acta* **106**:1:297–303.
- Contreras, L. M., F. J. Aranda, F. Gavilanes, J. M. González-Ros, and J. Villalain. 2001. Structure and interaction with membrane model systems of a peptide derived from the major epitope region of HIV protein gp41. Implications on viral fusion mechanism. *Biochemistry* **40**:3196–3207.
- Dimitrov, D. S. 2003. The secret life of ACE2 as a receptor for the SARS virus. *Cell* **115**:652–653.
- Drosten, C., S. Gunther, W. Preiser, S. van der Werf, H. R. Brodt, S. Becker, H. Rabenau, M. Panning, L. Kolesnikova, R. A. Fouchier, A. Berger, A. M. Burguiere, J. Cinatl, M. Eickmann, N. Escrimer, K. Grywna, S. Kramme, J. C. Manuguerra, S. Muller, V. Rickerts, M. Stürmer, S. Vieth, H. D. Klenk, A. D. Osterhaus, H. Schmitz, and H. W. Doerr. 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**:1967–1976.
- Eckert, D. M., and P. S. Kim. 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:777–810.
- Eisenberg, D., E. Schwarz, M. Komaromy, and R. Wall. 1984. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **179**:125–142.
- Eisenberg, D., R. M. Weiss, and T. C. Terwilliger. 1982. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* **299**:371–374.
- Engelman, D. M., T. A. Steitz, and A. Goldman. 1986. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **15**:321–353.
- Epand, R. M. 2003. Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**:116–121.
- Frana, M. F., J. N. Behnke, L. S. Sturman, and K. V. Holmes. 1985. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. *J. Virol.* **56**:912–920.
- Gallo, S. A., C. M. Finnegan, M. Viard, Y. F. Raviv, A. Dimitrov, S. S. Rawat, A. Puri, S. Durell, and R. Blumenthal. 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**:36–50.
- de Haan, C. A., K. Stadler, G. J. Godeke, B. J. Bosch, and P. J. Rottier. 2004. Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion. *J. Virol.* **78**:6048–6054.
- Hope, M. J., M. B. Bally, G. Webb, and P. R. Cullis. 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* **812**:55–65.
- Ingallinella, P., E. Bianchi, M. Finotto, G. Cantoni, D. M. Eckert, V. M. Supekar, C. Bruckmann, A. Carli, and A. Pessi. 2004. Structural characterization of the fusion-active complex of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:8709–8714.
- Ksiazek, T. G., D. Erdman, C. S. Goldsmith, S. R. Zaki, T. Peret, S. Emery, S. Tong, C. Urbani, J. A. Comer, W. Lim, P. E. Rollin, S. F. Dowell, A. E. Ling, C. D. Humphrey, W. J. Shieh, J. Guarner, C. D. Paddock, P. Rota, B. Fields, J. DeRisi, J. Y. Yang, N. Cox, J. M. Hughes, J. W. LeDuc, W. J. Bellini, and L. J. Anderson. 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**:1953–1966.
- Liu, S., G. Xiao, Y. Chen, Y. He, J. Niu, C. R. Escalante, H. Xiong, J. Farfar, A. K. Debnath, P. Tien, and S. Jiang. 2004. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet* **363**:938–947.
- Luo, Z., A. M. Matthews, and S. R. Weiss. 1999. Amino acid substitutions within the leucine zipper domain of the murine coronavirus spike protein cause defects in oligomerization and the ability to induce cell-to-cell fusion. *J. Virol.* **73**:8152–8159.
- McIntosh, T. J. 2004. The 2004 Biophysical Society-Avanti Award in Lipids: roles of bilayer structure and elastic properties in peptide localization in membranes. *Chem. Phys. Lipids* **130**:83–98.
- Moreno, M. R., R. Pascual, and J. Villalain. 2004. Identification of membrane-active regions of the HIV-1 envelope glycoprotein gp41 using a 15-mer gp41-peptide scan. *Biochim. Biophys. Acta* **1661**:97–105.
- Müller, M., C. Meijer, G. J. Zaman, P. Borst, R. J. Scheper, N. H. Mulder, E. G. de Vries, and P. L. Jansen. 1994. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:13033–13037.
- Muñoz-Barroso, I., K. Salzwedel, E. Hunter, and R. Blumenthal. 1999. Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immuno-

- deficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J. Virol.* **73**:6089–6092.
28. **Nguyen, D. H., and J. E. K. Hildreth.** 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J. Virol.* **74**:3264–3272.
 29. **Pascual, R., M. R. Moreno, and J. Villalain.** A peptide pertaining to the loop segment of HIV gp41 binds and interacts with model biomembranes. Implications for the fusion mechanism. *J. Virol.*, in press.
 30. **Peiris, J. S., S. T. Lai, L. L. Poon, Y. Guan, L. Y. Yam, W. Lim, J. Nicholls, W. K. Yee, W. W. Yan, M. T. Cheung, V. C. Cheng, K. H. Chan, D. N. Tsang, R. W. Yung, T. K. Ng, and K. Y. Yuen.** 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**:1319–1325.
 31. **Peiris, J. S., K. Y. Yuen, A. D. Osterhaus, and K. Stohr.** 2003. The severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **349**:2431–2441.
 32. **Peisajovich, S. G., and Y. Shai.** 2003. Viral fusion proteins: multiple regions contribute to membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**:122–129.
 33. **Phalen, T., and M. Kielian.** 1991. Cholesterol is required for infection by Semliki Forest Virus. *J. Cell Biol.* **112**:615–623.
 34. **Prabakaran, P., X. Xiao, and D. S. Dimitrov.** 2004. A model of the ACE2 structure and function as a SARS-CoV receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**:235–241.
 35. **Rota, P. A., M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M. H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Gunther, A. D. Osterhaus, C. Drosten, M. A. Pallansch, L. J. Anderson, and W. J. Bellini.** 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**:1394–1399.
 36. **Sáez-Cirión, A., J. L. Arrondo, M. J. Gomara, M. Lorizate, I. Iloro, G. Melikyan, and J. L. Nieva.** 2003. Structural and functional roles of HIV-1 gp41 pretransmembrane sequence segmentation. *Biophys. J.* **85**:3769–3780.
 37. **Sáez-Cirión, A., M. J. Gómara, A. Aguirre, and J. L. Nieva.** 2003. Pre-transmembrane sequence of Ebola glycoprotein interfacial hydrophobicity distribution and interaction with membranes. *FEBS Lett.* **533**:47–53.
 38. **Sáez-Cirión, A., S. Nir, M. Lorizate, A. Aguirre, A. Cruz, J. Pérez-Gil, and J. L. Nieva.** 2002. Sphingomyelin and cholesterol promote HIV-1 gp41 pre-transmembrane sequence surface aggregation and membrane restructuring. *J. Biol. Chem.* **277**:21776–21785.
 39. **Salzwedel, K., J. T. West, and E. Hunter.** 1999. A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J. Virol.* **73**:2469–2480.
 40. **Sturman, L. S., C. S. Ricard, and K. V. Holmes.** 1985. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. *J. Virol.* **56**:904–911.
 41. **Suárez, T., S. Nir, F. M. Goñi, A. Sáez-Cirión, and J. L. Nieva.** 2000. The pre-transmembrane region of the human immunodeficiency virus type-1 glycoprotein: a novel fusogenic sequence. *FEBS Lett.* **477**:145–149.
 42. **Taguchi, F.** 1995. The S2 subunit of the murine coronavirus spike protein is not involved in receptor binding. *J. Virol.* **69**:7260–7263.
 43. **Tripet, B., M. W. Howard, M. Jobling, R. K. Holmes, K. V. Holmes, and R. S. Hodges.** 2004. Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core. *J. Biol. Chem.* **279**:20836–20849.
 44. **Vicenta, N., C. Genina, and E. Malvoisina.** 2002. Identification of a conserved domain of the HIV-1 transmembrane protein gp41 which interacts with cholesteryl groups. *Biochim. Biophys. Acta* **1567**:157–164.
 45. **White, S. H., and W. C. Wimley.** 1999. Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**:319–365.
 46. **Wimley, W. C., and S. H. White.** 1996. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat. Struct. Biol.* **3**:842–848.
 47. **Xiao, X., S. Chakraborti, A. S. Dimitrov, K. Gramatikoff, and D. S. Dimitrov.** 2003. The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**:1159–1164.
 48. **York, J., and J. H. Nunberg.** 2004. Role of hydrophobic residues in the central ectodomain of gp41 in maintaining the association between human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein subunits gp120 and gp41. *J. Virol.* **78**:4921–4926.
 49. **Zelus, B. D., J. H. Schickli, D. M. Blau, S. R. Weiss, and K.V. Holmes.** 2003. Conformational changes in the spike glycoprotein of murine coronavirus are induced at 37°C either by soluble murine CEACAM1 receptors or by pH 8. *J. Virol.* **77**:830–840.
 50. **Zhu, J., G. Xiao, Y. Xu, F. Yuan, C. Zheng, Y. Liu., H. Yan, D. K. Cole, J. I. Bell, Z. Rao, P. Tien, and G. F. Gao.** 2004. Following the rule: formation of the 6-helix bundle of the fusion core from severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein and identification of potent peptide inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**:283–288.





Publicación

2

Interaction of a peptide from the pre-transmembrane domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein with phospholipid membranes.

Jaime Guillén, Miguel R. Moreno, Ana J. Pérez-Berná, Ángela Bernabeu, and José Villalaín

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad "Miguel Hernández", Elche-Alicante, Spain.

J. Phys. Chem. B, 2007, 111; 13714 -13725.

Interaction of a Peptide from the Pre-transmembrane Domain of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein with Phospholipid Membranes

Jaime Guillén, Miguel R. Moreno, Ana J. Pérez-Berná, Angela Bernabeu, and José Villalain*

Instituto de Biología Molecular y Celular, Campus de Elche, Universidad "Miguel Hernández", E-03202 Elche-Alicante, Spain

Received: May 14, 2007; In Final Form: September 25, 2007

The severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) envelope spike (S) glycoprotein, a Class I viral fusion protein, is responsible for the fusion between the membranes of the virus and the target cell. In order to gain new insight into the protein membrane alteration leading to the viral fusion mechanism, a peptide pertaining to the putative pre-transmembrane domain (PTM) of the S glycoprotein has been studied by infrared and fluorescence spectroscopies regarding its structure, its ability to induce membrane leakage, aggregation, and fusion, as well as its affinity toward specific phospholipids. We demonstrate that the SARS-CoV PTM peptide binds to and interacts with phospholipid model membranes, and, at the same time, it adopts different conformations when bound to membranes of different compositions. As it has been already suggested for other viral fusion proteins such as HIV gp41, the region of the SARS-CoV protein where the PTM peptide resides could be involved in the merging of the viral and target cell membranes working synergistically with other membrane-active regions of the SARS-CoV S glycoprotein to heighten the fusion process and therefore might be essential for the assistance and enhancement of the viral and cell fusion process.

Introduction

A new infectious disease, defined as severe acute respiratory syndrome or SARS, emerged in Southern China in the autumn of 2002 and was originated by a novel type of coronavirus, SARS-CoV. This disease, which infects humans causing an atypical and often lethal pneumonia, spread to more than 20 countries in Asia, North America, South America, and Europe in the spring of 2003.^{1–5} Approximately 8400 people worldwide suffered from SARS, and more than 800 deaths were recognized according to the World Health Organization. It was hypothesized that the new virus was originated from wild animals, and promptly a coronavirus was identified in civet cats from Southern China with a sequence identity of more than 99% to the SARS-CoV. Therefore, the possibility of a future outbreak coming out from a natural reservoir cannot be ruled out.

Coronaviruses are a diverse group of enveloped, positive-stranded RNA viruses, with 3–4 proteins embedded in the envelope, that cause respiratory and enteric diseases in humans and other animals. SARS-CoV infection, similarly to other envelope viruses, is achieved through fusion of the lipid bilayer of the viral envelope with the host cell membrane. The SARS-CoV virion, as with other coronaviruses, consists of a nucleocapsid core surrounded by an envelope containing three membrane proteins: spike, membrane, and envelope proteins. The spike glycoprotein S, responsible for the characteristic spikes of the SARS-CoV, is a surface glycoprotein that mediates viral entry by binding to the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2⁶ and induces membrane fusion. In some strains, protein S is cleaved by a protease to yield two noncovalently associated subunits, S1 and S2 (Figure 1), but cleavage is not an absolute requirement for the mechanism of fusion.⁷ The

receptor binding domain, localized in domain S1 and mapped to amino acids 318–510,^{8,9} defines the host range of the virus,¹⁰ while S2 is responsible for the fusion between the viral and cellular membranes.^{10,11} S2 contains two highly conserved heptad repeat regions (HR1 and HR2),^{12–18} similarly to other viral fusion proteins, including HIV-1 gp41, influenza hemagglutinin HA2, Ebola virus glycoprotein, and paramyxovirus F protein.^{19–22} All of them have been classified as Class I transmembrane glycoproteins and are displayed on the surface of the viral membrane as oligomers. Class I viral proteins also contain a hydrophobic region denoted as the fusion peptide (FP) and another hydrophobic region immediately adjacent to the membrane-spanning domain denoted as the pre-transmembrane domain (PTM). Under the current model for membrane fusion, there are at least three conformational states of the envelope fusion protein: the pre-fusion native state, the pre-hairpin intermediate state, and the post-fusion hairpin state.^{23–27} The first step in membrane fusion involves the exposure of the FP and, later on, its insertion into the host cell lipid bilayer. Subsequently, the heptad repeat regions HR1 and HR2 are exposed in an intermediate state binding each other to form a coiled-coil structure facilitating the juxtaposition of the FP and PTM segments, bringing in close proximity the viral and cellular membranes; this is followed by virus-cell membrane fusion and viral entry.

Studies with a number of viral fusion proteins have shown that the region immediately adjacent to the membrane-spanning domain plays an essential role in the fusogenic activities of these proteins, being a common characteristic to other Class I viral fusion proteins of several virus families.^{28–33} For example, the membrane-proximal domain of HIV-1 gp41 contains several Trp residues that are invariant between different strains, and deletion of this membrane-proximal region or substitution of the conserved Trp residues blocked the cell–cell fusion activity of gp41.³⁰ Through experiments using synthetic peptides

* Corresponding author. Address: Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad "Miguel Hernández", E-03202 Elche-Alicante, Spain. Tel: +34 966 658 762. Fax: +34 966 658 758. E-mail: jvillalain@umh.es.

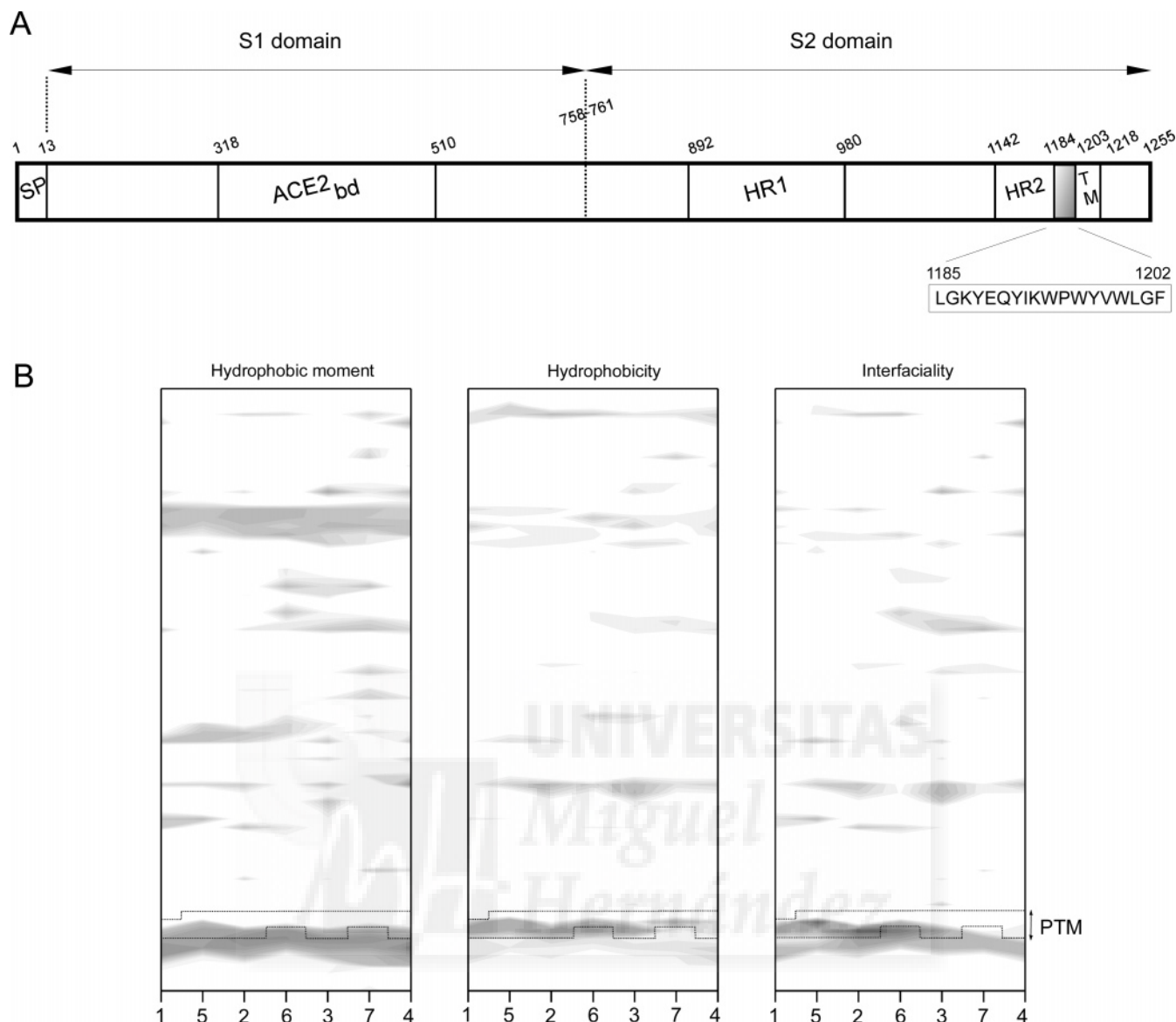


Figure 1. (A) Schematic view of the organization of SARS-CoV spike glycoprotein S (amino acid residues 1–1255 for the full length), as well as the S1 and S2 subunits, showing the approximate structural and functional regions: the N-terminal signal peptide (SP), the ACE2 binding domain, the transmembrane domain (TM), and the predicted heptad repeat regions pertaining to the S2 subunit, HR1 and HR2. The fusion domain is located at the N-terminus of the S2 subunit. Also shown is the sequence of the peptide used in this work. It should be noted that the size of each domain is not drawn to an exact scale. (B) Hydrophobic moment, hydrophobicity, interfaciality distribution, and relative position of the peptide used in this study along the SARS-CoV spike S2 domain, assuming it forms an α -helical wheel (see ref 29 for details). Only positive bilayer-to-water transfer free-energy values are depicted (shaded areas).

analogous to the aromatic domains of HIV-1 and EboV, it has been demonstrated that these peptides may aid in the disruption of the viral membrane during fusion and are capable of inducing membrane leakage and lipid mixing of model phospholipid membranes.^{28,29,34–38} Recently, the presence of this highly hydrophobic aromatic domain has been shown in SARS-CoV;^{39,40} in addition, this region displays a surface patch with high bilayer-to-water transfer free-energy values (Figure 1). Interestingly, the PTM domain of coronavirus fusion proteins is highly conserved, having a high content of aromatic residues.

Although much information has been obtained in recent years on membrane fusion, we do not know yet the processes and the mechanism behind virus–host cell membrane fusion. Elucidating the nature of the interactions between phospholipids, membrane proteins, and peptides is essential for the understanding of the structure and function of membrane proteins, clarifying the specific roles of specific types of phospholipids in biological membranes. In the present work, we report our

results on the determination of the secondary structure and the interaction with model membranes of a peptide pertaining to the aromatic pre-transmembrane domain of SARS-CoV (SARS-CoV PTM), the structural changes of which take place in both the peptide and phospholipid molecules, induced by membrane binding and interaction with the lipid bilayer through a series of complementary experiments such as leakage, fusion, and aggregation. Moreover, we show that SARS-CoV PTM strongly partitions into phospholipid membranes and can be localized at different depths depending on the phospholipid composition of the vesicles. These results would suggest that the SARS-CoV PTM could be involved in the merging of the viral and target cell membranes working synergistically with other membrane-active regions of the S spike glycoprotein.

Materials and Methods

Materials and Reagents. The synthetic peptide encompassing residues 1185–1202 of SARS-CoV (¹¹⁸⁵LGKYEQYIKW-

PWYVWLG¹²⁰²) was synthesized with N-terminal acetylation and C-terminal amidation on an automatic multiple synthesizer (Genemed Synthesis, San Francisco, CA). The peptide was purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography to >95% purity, and its composition and molecular mass were confirmed by amino acid analysis and mass spectroscopy. Since trifluoroacetate has a strong infrared absorbance at approximately 1673 cm⁻¹, which interferes with the characterization of the peptide Amide I band,⁴¹ residual trifluoroacetic acid, used both in peptide synthesis and in the high-performance liquid chromatography mobile phase, was removed by several lyophilization/solubilization cycles in 10 mM HCl.⁴² Egg L- α -phosphatidylcholine (EPC), egg sphingomyelin (SM), bovine brain phosphatidylserine (BPS), egg trans-esterified L- α -phosphatidylethanolamine (TPE), bovine liver L- α -phosphatidylinositol (BPI), 1,2-dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), 1,2-dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG), 1,2-dimyristoylphosphatidylserine (DMPS), 1,2-dimyristoylphosphatidic acid (DMPA), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphoethanolamine (POPE), cholesterol (Chol), lissamine rhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (N-Rh-PE), and N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (NBD-PE) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). 5-Carboxyfluorescein (CF, >95% by HPLC), 5-doxy-stearic acid (5NS), 16-doxy-stearic acid (16NS), sodium dithionite, deuterium oxide (99.9% by atom), Triton X-100, EDTA, and HEPES were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), and 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Porcine lungs were obtained from a local slaughterhouse. Plasma membrane (LE) from lung tissue pneumocytes was obtained according to ref 43, and lipid extraction was performed according to the Bligh and Dyer procedure using a ratio of 1:1:0.9 (v/v/v) between chloroform, methanol, and the corresponding aqueous sample.⁴⁴ All other chemicals were commercial samples of the highest purity available (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Water was deionized, twice-distilled, and passed through Milli-Q equipment (Millipore Ibérica, Madrid) to a resistivity higher than 18 M Ω cm.

Sample Preparation. For FTIR spectroscopy, aliquots containing the appropriate amount of lipid in chloroform/methanol (2:1, v/v) were placed in a test tube containing 200 μ g of dried lyophilized peptide. After vortexing, the solvents were removed by evaporation under a stream of O₂-free nitrogen, and, finally, traces of solvents were eliminated under vacuum in the dark for more than 3 h. The samples were hydrated in 200 μ L of D₂O buffer containing 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, and 0.1 mM EDTA, pH 7.4, and incubated at 10 °C above the phase transition temperature (T_m) of the phospholipid mixture with intermittent vortexing for 45 min to hydrate the samples and obtain multilamellar vesicles (MLVs). The samples were frozen and thawed five times to ensure complete homogenization and maximization of peptide/lipid contacts with occasional vortexing. Finally, the suspensions were centrifuged at 15 000 rpm at 25 °C for 15 min to remove the possible peptide unbound to the membranes. The pellet was resuspended in 25 μ L of D₂O buffer and incubated for 45 min at 10 °C above the T_m of the lipid mixture, unless stated otherwise. Large unilamellar vesicles (LUVs) with a mean diameter of 100 nm (leakage assay) and 200 nm (fusion assays) were used to study vesicle leakage. They were prepared from MLVs in the absence of peptide by the extrusion method⁴⁵ using polycarbonate filters with a pore size of 0.1 and 0.2 μ m (Nuclepore Corp., Cambridge, CA). The

phospholipid mixture resembling the membrane of lung tissue pneumocytes (LPM) contained EPC/BPI/BPS/SM/TPE/Chol at a molar percentage of 27.7:7.5:10.5:9.4:26.2:18.7.⁴⁶ The phospholipid and peptide concentration were measured by methods described previously.^{47,48}

Membrane Leakage Measurement. LUVs with a mean diameter of 0.1 μ m were prepared as indicated above in buffer containing 10 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 7.4, and CF at a concentration of 40 mM. Non-encapsulated CF was separated from the vesicle suspension through a Sephadex G-75 filtration column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) eluted with buffer containing 10 mM Tris, 100 mM NaCl, and 1 mM EDTA, pH 7.4. Membrane rupture (leakage) of intraliposomal CF was assayed by treating the probe-loaded liposomes (final lipid concentration, 0.125 mM) with the appropriate amounts of peptide on microtiter plates using a microplate reader (FLU-Ostar; BMG Labtech, Offenburg, Germany), stabilized at 25 °C with the appropriate amounts of peptide, each well containing a final volume of 170 μ L. The medium in the microtiter plates was continuously stirred to allow the rapid mixing of peptide and vesicles. Leakage was assayed until no more change in fluorescence was obtained. Fluorescence was measured using a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter. For details, see references 49 and 50.

Inner-Monolayer Phospholipid-Mixing (Fusion) Measurement. Peptide-induced phospholipid mixing of the inner monolayer was measured by resonance energy transfer.⁵¹ This assay is based on the decrease in resonance energy transfer between two probes (NBD-PE and RhB-PE) when the lipids of the probe-containing vesicles are allowed to mix with lipids from vesicles lacking the probes. The concentration of each of the fluorescent probes within the liposome membrane was 0.6% mol. LUVs with a mean diameter of 0.2 μ m were prepared as described above. LUVs were treated with sodium dithionite to completely reduce the NBD-labeled phospholipid located at the outer monolayer of the membrane. The final concentration of sodium dithionite was 100 mM (from a stock solution of 1 M dithionite in 1 M Tris, pH 10.0) and incubated for approximately 1 h on ice in the dark. Sodium dithionite was then removed by size exclusion chromatography through a Sephadex G-75 filtration column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) eluted with buffer containing 10 mM Tris, 100 mM NaCl, and 1 mM EDTA, pH 7.4. The proportion of labeled and unlabeled vesicles, lipid concentration, and other experimental and measurement conditions were the same as indicated previously.⁵⁰

Liposome Aggregation. LUVs with a mean diameter of 0.2 μ m were prepared in buffer containing 10 mM Tris, 0.1 M NaCl, and 1 mM EDTA. Peptide-induced vesicle aggregation was detected by monitoring the optical density at 405 nm on a 96-well Anthos spectrometer. All measurements were performed at room temperature on microtiter plates, each well containing a final volume of 150 μ L. The lipid concentration was 0.27 mM in all experiments, and the measured optical density was corrected for dilution upon peptide addition. The absorbance value for the vesicle suspension with the peptide was normalized according to the initial absorbance value of the vesicle suspension without peptide.

Peptide Binding to Vesicles. The partitioning of the peptide into the phospholipid bilayer was monitored by the fluorescence enhancement of tryptophan. Fluorescence spectra were recorded in an SLM Aminco 8000C spectrofluorometer with excitation and emission wavelengths of 290 and 348 nm, respectively, and 4 nm spectral bandwidths. Measurements were carried out in 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, and 0.1 mM EDTA, pH 7.4.

Intensity values were corrected for dilution, and the scatter contribution was derived from lipid titration of a vesicle blank. Partitioning coefficients were obtained using⁵²

$$\frac{I}{I_0} = 1 + \left(\frac{I_{\max}}{I_0} - 1 \right) \left(\frac{k[L]}{[W] + k[L]} \right)$$

where k is a mole fraction partition coefficient that represents the amount of peptide in the bilayers as a fraction of the total peptide present in the system, I_{\max} is a variable value for the fluorescence enhancement at complete partitioning determined by fitting the equation to the experimental data, $[L]$ is the lipid concentration, and $[W]$ is the concentration of water (55.3 M).

Acrylamide Quenching of Trp Emission. For acrylamide quenching assays, aliquots from a 4 M solution of the water-soluble quencher were added to the solution-containing peptide in the presence and absence of liposomes at a peptide/lipid molar ratio of 1:100. The results obtained were corrected for dilution, and the scatter contribution was derived from acrylamide titration of a vesicle blank. The data were analyzed as previously described.⁴⁹

Fluorescence Quenching by Lipophilic Probes. Quenching studies with lipophilic probes were performed by successive addition of small amounts of 5NS or 16NS in ethanol to the samples of the peptide incubated with LUV. The final concentration of ethanol was kept below 2.5% (v/v) to avoid any significant bilayer alterations. After each addition, an incubation period of 15 min was maintained before the measurement. The excitation and emission wavelengths were 290 and 348 nm, respectively. The data were analyzed as it has been described previously.⁴⁹

Steady-State Fluorescence Anisotropy. MLVs were formed in 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, and 0.1 mM EDTA, pH 7.4. Aliquots of TMA-DPH or DPH in *N,N'*-dimethylformamide were directly added into the lipid dispersion to obtain a probe/lipid molar ratio of 1/500. Samples were incubated for 15 or 60 min when TMA-DPH or DPH was used, respectively, 10 °C above the gel-to-liquid-crystalline phase transition temperature T_m of the phospholipid mixture. Afterward, the peptides were added to obtain a peptide/lipid molar ratio of 1/15 and were incubated 10 °C above the T_m of each lipid for 1 h, with occasional vortexing. All fluorescence studies were carried out using 5 mm × 5 mm quartz cuvettes in a final volume of 400 μ L (315 μ M lipid concentration). The steady-state fluorescence anisotropy, $\langle r \rangle$, was measured with an automated polarization accessory using a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrometer, coupled to a Peltier for automatic temperature change, as described previously.⁴⁹

Infrared Spectroscopy. Approximately 25 μ L of a pelleted sample in D₂O were placed between two CaF₂ windows separated by 56- μ m thick Teflon spacers in a liquid demountable cell (Harrick, Ossining, NY). The spectra were obtained in a Bruker IFS55 spectrometer using a deuterated triglycine sulfate detector. Each spectrum was obtained by collecting 200 interferograms with a nominal resolution of 2 cm⁻¹, transformed using triangular apodization, and, in order to average background spectra between sample spectra over the same time period, a sample shuttle accessory was used to obtain sample and background spectra. The spectrometer was continuously purged with dry air at a dew point of -40 °C in order to remove atmospheric water vapor from the bands of interest. All samples were equilibrated at the lowest temperature for 20 min before acquisition. An external bath circulator, connected to the infrared spectrometer, controlled the sample temperature. For temperature

studies, samples were scanned using 2 °C intervals and a 2-min delay between each consecutive scan. Subtraction of buffer spectra taken at the same temperature as that of the samples was performed interactively using either GRAMS/32 or Spectra-Calc (Galactic Industries, Salem, MA) as described previously.^{57,58} Frequencies at the center of gravity, when necessary, were measured by taking the top 10 points of each specific band and fitting them to a Gaussian band. The criterion used for buffer subtraction in the C=O and amide regions was the removal of the band near 1210 cm⁻¹ and a flat baseline between 1800 and 2100 cm⁻¹. Band-narrowing strategies were applied to resolve the component bands in the Amide I' region as previously reported.⁵⁹ Peptide secondary structure elements were quantified from a curve-fitting analysis by band decomposition of the original Amide I' band after spectral smoothing (for details, see references 49 and 59).

Results

Recently, the existence of different membranotropic regions in the SARS-CoV Spike glycoprotein has been shown by using a peptide library encompassing the full sequence of the envelope glycoprotein,³⁹ which includes a highly hydrophobic aromatic domain similar to other Class I fusion membrane proteins.^{39,40} Since this region could be important in the membrane fusion process,⁵ we present here the results of the study of the interaction of a peptide derived from this region, SARS-CoV PTM, contiguous to the putative transmembrane domain, with model membranes (Figure 1).

The ability of the SARS-CoV PTM peptide to interact with membranes was determined from fluorescence studies of its three Trp residues in the presence of model membranes containing different phospholipid compositions at different lipid/peptide ratios.⁶² The Trp fluorescence intensity of the SARS-CoV PTM peptide increased upon increasing the lipid/peptide ratio, indicating a significant change in the environment of the Trp moieties of the peptide (Figure 2A). The change on the Trp fluorescence of the peptide has allowed us to obtain its partition coefficient, K_p . K_p values in the range 10⁴–10⁵ were obtained for the different phospholipid compositions studied (Table 1), indicating that the peptide was bound to the membrane surface with high affinity. Similar K_p values have been found for other peptides in the presence of model membranes.^{56–58,62} Higher K_p values were obtained for negatively charged phospholipid-containing bilayers and for EPC-containing liposomes (i.e., without cholesterol) than those corresponding to liposomes containing SM and TPE as well as for LPM and LE liposomes (Table 1). These results were further corroborated by the displacement in the emission frequency maximum of Trp in the presence of phospholipid LUVs. In solution, the peptide had an emission maximum at 347 nm when excited at the absorbance maximum, typical for Trp in a polar environment, whereas, in the presence of increasing concentrations of liposomes, the emission maximum of the Trp presented a shift of about 6–10 nm to lower wavelengths, implying that Trp sensed a low-polarity environment (entered in a hydrophobic environment) upon interaction with the membrane.

To investigate the accessibility of the Trp residues of the SARS-CoV PTM peptide to the aqueous phase in the presence of membranes having different phospholipid compositions, we used acrylamide, a neutral, water-soluble, highly efficient quenching probe. Stern–Volmer plots for the quenching of Trp by acrylamide, recorded in the absence and presence of lipid vesicles, are shown in Figure 2B. Linear Stern–Volmer plots are indicative of all Trp residues being accessible to acrylamide,

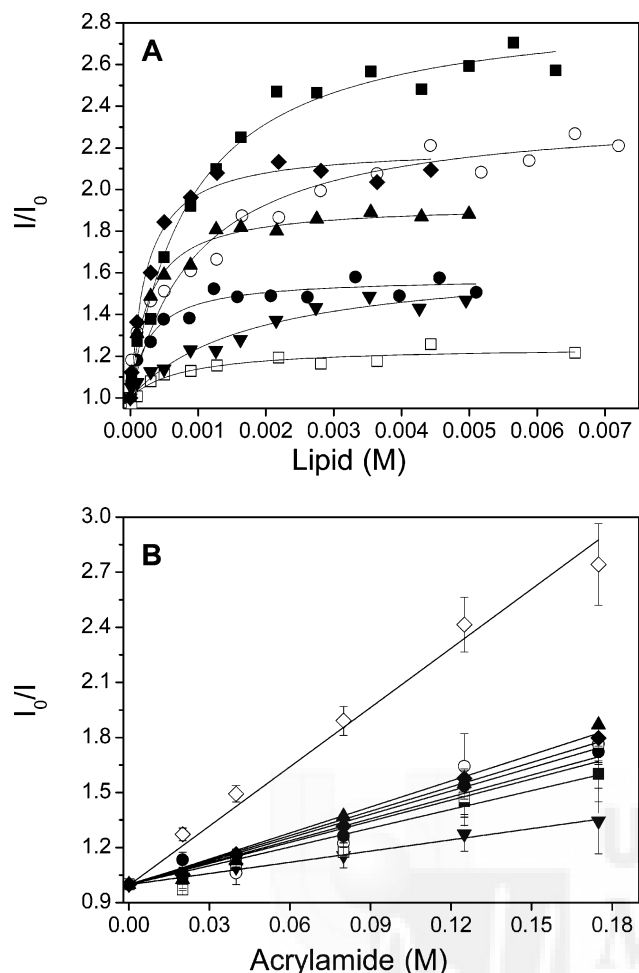


Figure 2. Change on the tryptophan fluorescence of the SARS-CoV PTM peptide in the presence of increasing lipid concentrations (A), acrylamide quenching studies of the tryptophan fluorescence of the peptide in aqueous solution (\diamond) and in the presence of LUVs having different lipid compositions (B). The lipid compositions used were EPC/BPI/CHOL at a molar ratio of 5:1:3 (\blacktriangle), EPC/BPS/CHOL at a molar ratio of 5:4:1 (\bullet), the LPM mixture (\blacktriangledown), the LE mixture (\square), EPC (\blacklozenge), EPC/TPE/CHOL at a molar ratio of 2:1:1 (\circ), and EPC/SM/CHOL at a molar ratio of 5:1:1 (\blacksquare).

and, in all cases, the quenching of the peptide Trp residues showed acrylamide-dependent concentration behavior. In aqueous solution, the Trp residues of the peptide were exposed to the solvent allowing for a more efficient quenching. However, in the presence of the phospholipid membranes, the quenching effect was smaller, indicating that the Trp residues of the peptide were poorly accessible to the aqueous phase, suggesting that the peptide was effectively incorporated into the membranes.

This is demonstrated by the lower K_{sv} values obtained from the corresponding Stern–Volmer plots (about 2–5 M^{-1}) compared to the K_{sv} value of about 11 M^{-1} obtained for the peptide in solution (Table 1).

The transverse location (penetration) of the SARS-CoV PTM peptide into the lipid bilayer was further investigated by monitoring the relative quenching of the fluorescence of the Trp residues by the lipophilic spin probes 5NS and 16NS when the peptide was incorporated in the fluid phase of vesicles having different phospholipid compositions (Figure 3). These two derivatized fatty acids differ in the position of the quencher moiety along the hydrocarbon chain and permit one to establish the depth of the peptide in the membrane by comparing the quenching results obtained with each of them. 5NS is a better quencher for molecules near or at the interface, while 16NS is a better probe for molecules buried deeply in the membrane. The variation of the fluorescence intensity with the increment of the effective concentration of both 5NS and 16NS probes is shown in Figure 3, along with the fitting lines obtained using eq 6, whereas the K_{sv} values for 5NS and 16NS are presented in Table 1. It can be seen that, in general, 16NS quenches the SARS-CoV PTM peptide fluorescence less efficiently than 5NS. Quenching depends on phospholipid composition, since the peptide is better quenched by 5NS in model membranes composed of EPC/TPE/Chol and the complex mixtures LE and LPM. However, model membranes composed of EPC, EPC/BPS/Chol, EPC/SM/Chol, or EPC/BPI/Chol present a lower quenching efficiency for both probes, which would indicate that the Trp residues are located at the membrane surface.

In order to explore the effect of the SARS-CoV PTM peptide in the destabilization of membrane vesicles, we studied their effect on the release of encapsulated fluorophores in model membranes made up of various compositions. The extent of leakage observed at different peptide to lipid molar ratios and the effect on different phospholipid compositions is shown in Figure 4A. It is interesting to note that the SARS-CoV PTM peptide induced a high percentage of leakage (leakage values between 85 and 100%), even at high lipid/peptide ratios as 30:1, for liposomes containing EPC, Chol, and/or SM (Figure 4A). Lower leakage values were obtained for liposomes composed of EPC alone, those containing BPI and BPS, and those composed of the complex phospholipid mixtures LE and LPM (40% and 25% leakage values were observed at a peptide-to-lipid ratio of 1:10). The lowest leakage value was found for liposomes containing TPE, which, at the highest peptide-to-lipid ratio studied, i.e., 1:10, only about 12% leakage was attained (Figure 4A). The induction of inner-monolayer lipid mixing (fusion) by the SARS-CoV PTM peptide, as a measure of its fusogenic activity, was tested with several types of vesicles utilizing the probe dilution assay,^{51,63} and the results are shown

TABLE 1: Partition Coefficients and Stern–Volmer Quenching Constants for the SARS CoV PTM Peptide in Buffer and Incorporated in LUVs of Different Compositions

LUV compositions	K_p	$\Delta\lambda^a$ (nm)	K_{sv} (M^{-1}) acrylamide	K_{sv} (M^{-1}) 5-NS	K_{sv} (M^{-1}) 16-NS
EPC	$2.33 \pm 0.43 \times 10^5$	8	4.47	1.37	1.94
EPC/SM/CHOL 5:1:1	$6.26 \pm 0.67 \times 10^4$	10	3.42	3.10	2.87
EPC/TPE/CHOL 2:1:1	$5.61 \pm 0.75 \times 10^4$	8	4.3	9.34	2.20
EPC/BPS/CHOL 5:4:1	$1.93 \pm 0.67 \times 10^5$	7	4.08	1.33	1.74
EPC/BPI/CHOL 5:1:3	$2.06 \pm 0.46 \times 10^5$	6	4.68	6.60	5.96
LPM	$7.04 \pm 0.62 \times 10^4$	7	2.05	7.66	2.70
LE	$3.06 \pm 0.40 \times 10^4$	10	3.87	5.87	3.50
SARS-CoV PTM in buffer			10.58		

^a $\Delta\lambda$ corresponds to a peptide/lipid ratio of 1:300.

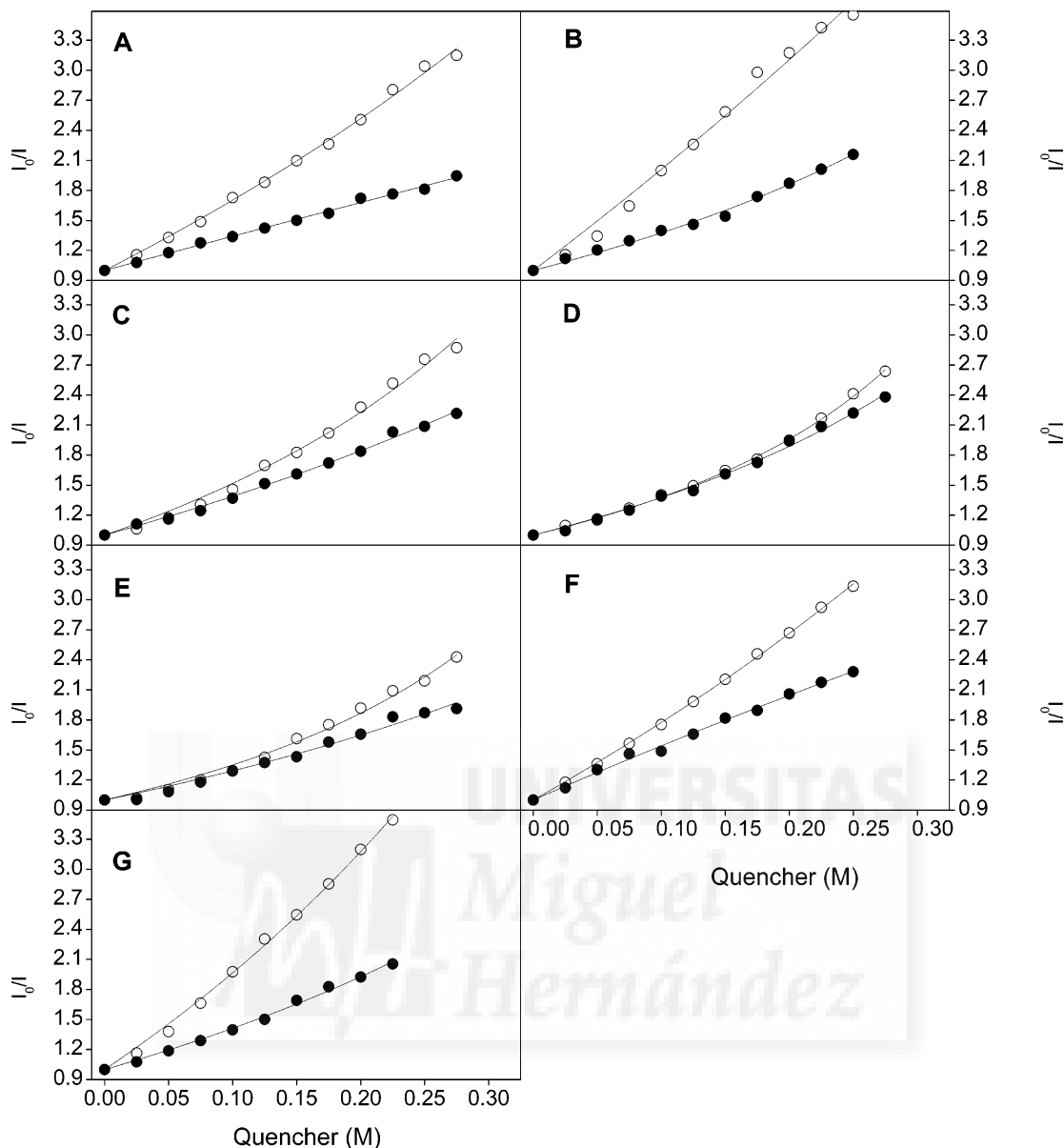


Figure 3. 5NS (○) and 16NS (●) quenching of Trp fluorescence of the SARS-CoV PTM peptide in the presence of LUVs for different lipid compositions. The lipid compositions used were (A) LE, (B) EPC/TPE/CHOL at a molar ratio of 2:1:1, (C) EPC/SM/CHOL at a molar ratio of 5:1:1, (D) EPC, (E) EPC/BPS/CHOL at a molar ratio of 5:4:1, (F) EPC/BPI/CHOL at a molar ratio of 5:1:3, and (G) LPM.

in Figure 4B. The higher fusion values were found for liposomes containing negatively charged phospholipids (liposomes containing BPI and BPS) as well as the complex LPM mixture (which also contains negatively charged phospholipids), which showed fusion values between 40 and 60%. Lower fusion values were observed for liposomes containing either SM and Chol or Chol (about 25% and 20% fusion, respectively). The other compositions studied showed fusion values lower than 10% (Figure 4B). The ability of the SARS-CoV PTM peptide to induce vesicle aggregation was tested in order to investigate whether this property correlated with peptide–membrane interaction as commented above. The changes in the absorbance of different liposome compositions as a function of the peptide-to-lipid molar ratio are shown in Figure 4C. It is interesting to note that the presence of negatively charged phospholipids in the liposomes favored the aggregation process, increasing more than 3 times the o.d. A similar effect was also found for the LPM complex mixture in comparison with the other liposome compositions. Lower aggregation values were obtained for the other liposomes tested. Significantly, the effect of the SARS-

CoV PTM peptide on the fusion values for the different membrane mixtures coincides with what has been observed in the aggregation assays (Figure 4C).

The effect of the SARS-CoV PTM peptide on the structural and thermotropic properties of phospholipid membranes was investigated by measuring the steady-state fluorescence anisotropy of the fluorescent probes DPH and TMA-DPH incorporated into model membranes composed of saturated synthetic phospholipids as a function of temperature (Figure 5). DPH and its derivatives are very useful fluorescent probes for monitoring the organization and dynamics of membranes, since fluorescence polarization is correlated to the rotational diffusion of membrane-embedded probes, itself sensitive to the packing of the fatty acyl chains.⁶⁴ These probes differ in their orientation and location in the membrane, so that it was possible to analyze the effect of the SARS-CoV PTM peptide on the structural and thermotropic properties along the full length of the palisade structure of the membrane, since DPH is known to partition mainly into the hydrophobic core of the membrane, whereas TMA-DPH is oriented at the membrane bilayer with its charge

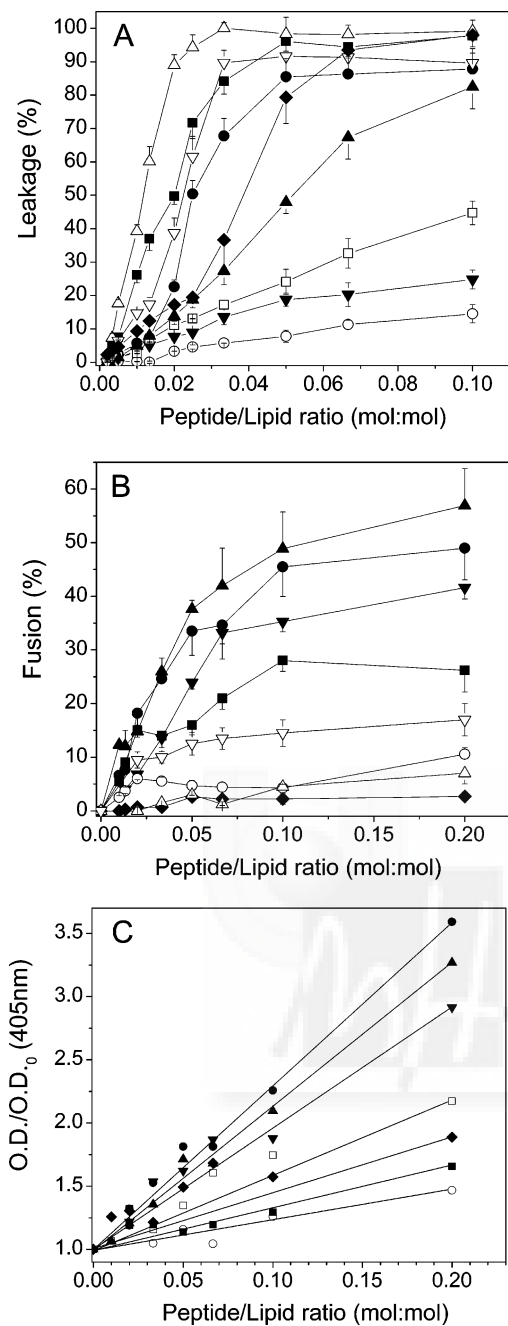


Figure 4. Effect of the SARS-CoV PTM peptide on (A) membrane rupture, i.e., leakage, (B) membrane lipid mixing of the inner monolayer, i.e., fusion, and (C) aggregation of LUVs having different lipid compositions at different peptide-to-lipid molar ratios. The lipid compositions used were EPC/SM 5:1 (Δ), EPC/BPS/CHOL at a molar ratio of 5:4:1 (\bullet), EPC (\blacklozenge), EPC/SM/CHOL at a molar ratio of 5:1:1 (\blacksquare), EPC/CHOL at a molar ratio of 5:1 (∇), EPC/BPI/CHOL at a molar ratio of 5:1:3 (\blacktriangle), the LPM mixture (\blacktriangledown), the LE mixture (\square), and EPC/TPE/CHOL at a molar ratio of 2:1:1 (\circ). In panel C, the lines connecting the experimental data are merely guides to the eye.

localized at the lipid–water interface.^{64–66} The SARS-CoV PTM peptide decreased the cooperativity of the transition as observed by both types of probes, as well as induced an increase of the anisotropy for DPH of about 0.02 anisotropy units both below and above the gel-to-liquid-crystalline transition T_m of DMPC, but only 0.015 anisotropy units below the T_m for TMA-DPH, suggesting that the peptide was able to decrease the mobility of the phospholipid acyl chains when compared to the pure phospholipid (Figures 5A and 5B). In the case of DMPS, a similar decrease in cooperativity was observed, concomitantly

with a shift of T_m of approximately 3–4 °C to lower temperatures (Figures 5C and 5D). For vesicles composed of DMPG, the SARS-CoV PTM peptide decreased the cooperativity of the transition, as well as it increased the anisotropy above T_m by 0.03–0.04 anisotropy units (Figures 5E and 5F), although an increase and a decrease of about 0.02 anisotropy units above and below T_m was observed for TMA-DPH. These differences could suggest that the difference in charge between DMPC, DMPS, and DMPG could affect the effects of the peptide incorporation into the membrane. When vesicles composed of POPE were studied, no effect was observed when DPH was used, but the PTM peptide decreased the anisotropy of TMA-DPH at all temperatures by 0.03–0.04 anisotropy units (Figure 5G,H). Moreover, when the PTM peptide was incorporated into DMPA-containing vesicles, neither the cooperativity nor the anisotropy below and above the T_m of the mixture was affected (Figure 5I,J). Taking into account these results together with the ones mentioned above, it could be suggested that the SARS-CoV PTM peptide, although interacting with the membrane, should be located at the lipid–water interface.⁵⁷

The existence of structural changes on the SARS-CoV PTM peptide induced by membrane binding has been studied by looking at the infrared Amide I' band located between 1700 and 1600 cm^{-1} . The infrared spectrum of the Amide I' region of the fully hydrated peptide in D_2O buffer at different temperatures is shown in Figure 6A. The spectrum was formed by different underlying components that gave place to a broad and asymmetric band whose frequency maximum changed as the temperature increased: whereas, at low temperatures, the maximum of the band was located at about 1630 cm^{-1} , at high temperatures, two bands were apparent, a broad band at about 1647 cm^{-1} and a narrow one at about 1626 cm^{-1} (Figure 6A). Whereas the broad band at about 1647 cm^{-1} corresponds to a mixture of unordered and helical structures,⁶⁷ the narrow band at about 1626 cm^{-1} corresponds to either β -sheet structures or self-aggregated peptides, forming an intermolecular network of hydrogen-bonded β -structures or both.⁶⁸ The infrared spectra in the Amide I' region of the SARS-CoV PTM peptide in the presence of DMPC, DMPG, and DMPA at phospholipid/peptide molar ratios of 15:1 are shown in Figure 6B–D, respectively. What is indeed significant is that the Amide I' region of the SARS-CoV PTM peptide in the presence of either DMPC or DMPG, taken at temperatures above and below the main phase transition temperature T_m of each specific phospholipid, was different. Outstandingly, the change in frequency of the Amide I' band took place at the same temperature as that at which the phase transition of DMPC and DMPG occurred, as observed by the shift of the C=O stretching maximum with temperature (Figure 6E,F); however, the observed change in frequency was different in the presence of each phospholipid since the frequency maximum of the Amide I' band of the peptide in the presence of DMPC decreased as the temperature increased, and the opposite was true in the presence of DMPG (Figures 6E,F). It is interesting to note that the bandwidth at half-height of the Amide I' band envelope when the peptide was bound to the membranes decreased about 3–4 cm^{-1} compared to the peptide in solution, indicating either the presence of additional structures contributing to the broader envelope for the peptide in solution or a different flexibility of the peptide or both. In contrast, the Amide I' envelope band of the SARS-CoV PTM peptide in the presence of DMPA presented a maximum at about 1626–1627 cm^{-1} at all temperatures studied (Figure 6D,G). These data suggest that the SARS-CoV PTM peptide has different second-

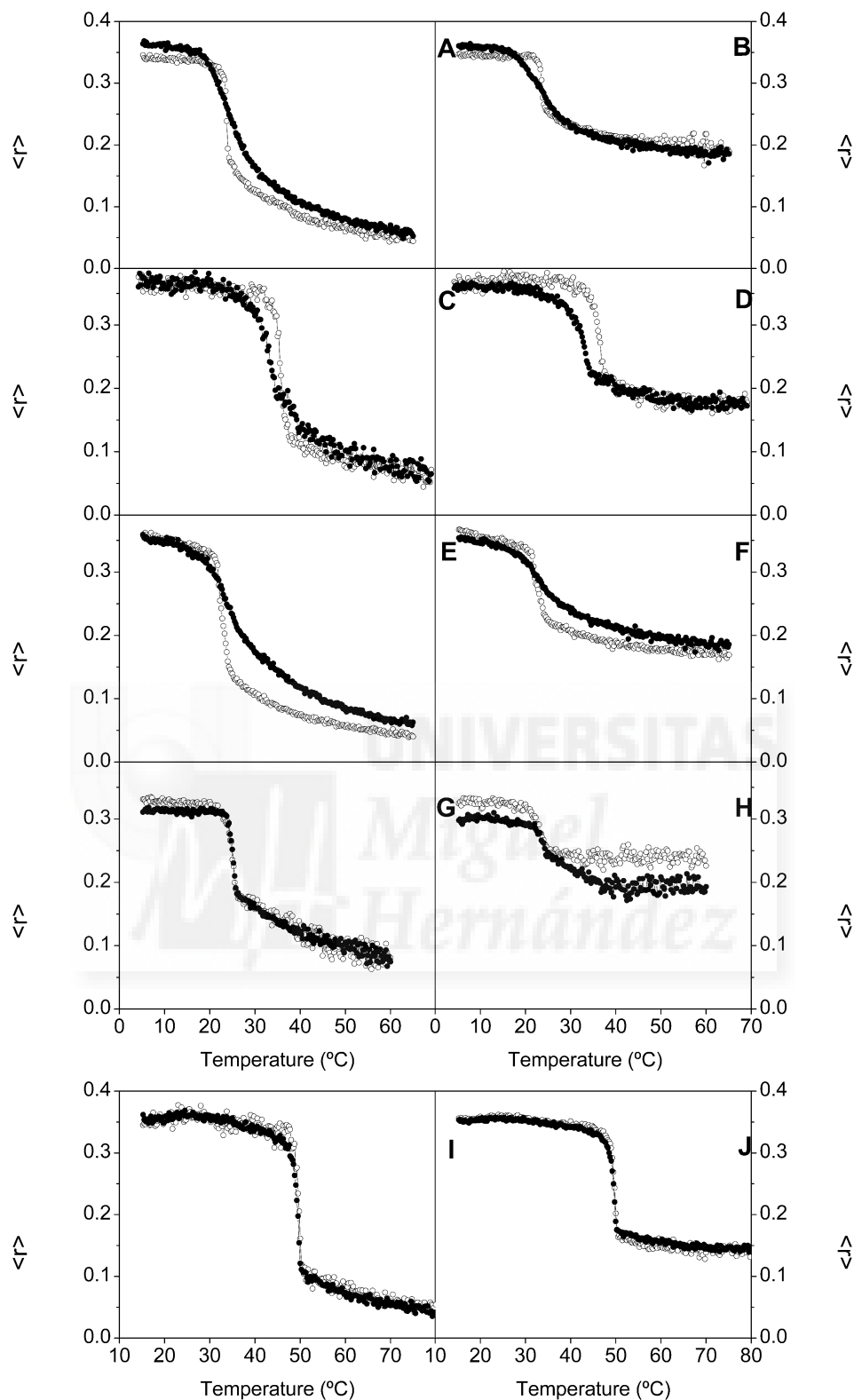


Figure 5. Anisotropy values, $\langle r \rangle$, of DPH (A,C,E,G,I) and TMA-DPH (B,D,F,H,J) fluorescent probes in model membranes composed of (A,B) DMPC, (C,D) DMPS, (E,F) DMPG, (G,H) POPE, and (I,J) DMPA as a function of temperature. Data correspond to vesicles in the absence (\circ) and in the presence (\bullet) of the SARS-CoV PTM peptide.

ary structures in the presence of different phospholipid types and phases (see below).

To assign the component bands to specific structural features and estimate the percentage of each component, we have decomposed the Amide I' infrared band as described in the Materials and Methods section and compared them to literature values.^{57,58,68} For the peptide in solution, we have identified different component bands at frequencies of about 1678, 1662,

1648, 1635, 1627, and 1612 cm^{-1} (Figure 7A). It is also possible to distinguish different component bands having similar frequencies as those found for the peptide in the presence of DMPC, DMPG, and DMPA (Figure 7B–D). The number and frequencies of the Amide I' component bands for these samples were similar to those found for the peptide in solution, but their intensity varied. To assign the component bands to specific structural features and estimate the percentage of each compo-

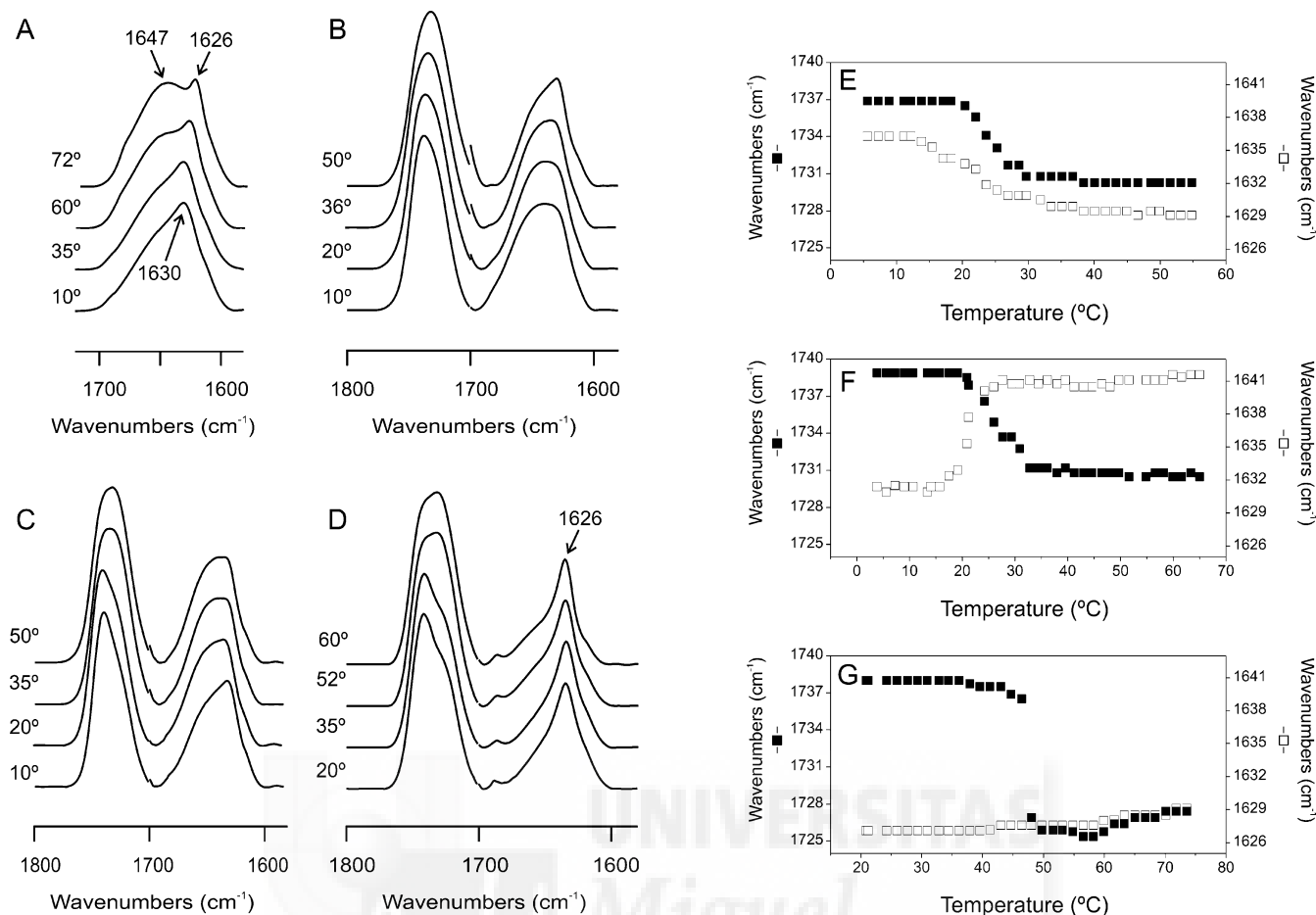


Figure 6. Stacked infrared spectra of the Amide I' and C=O regions for samples containing the SARS-CoV PTM peptide in solution (A) and in the presence of DMPC (B), DMPG (C), and DMPA (D) at different temperatures as indicated. Also shown is the temperature dependence of the frequency maximum of the phospholipid C=O symmetric stretching (■) and the peptide Amide I' (□) bands for samples containing the SARS-CoV PTM peptide and (E) DMPC, (F) DMPG, and (G) DMPA. The phospholipid-to-peptide molar ratio was 15:1.

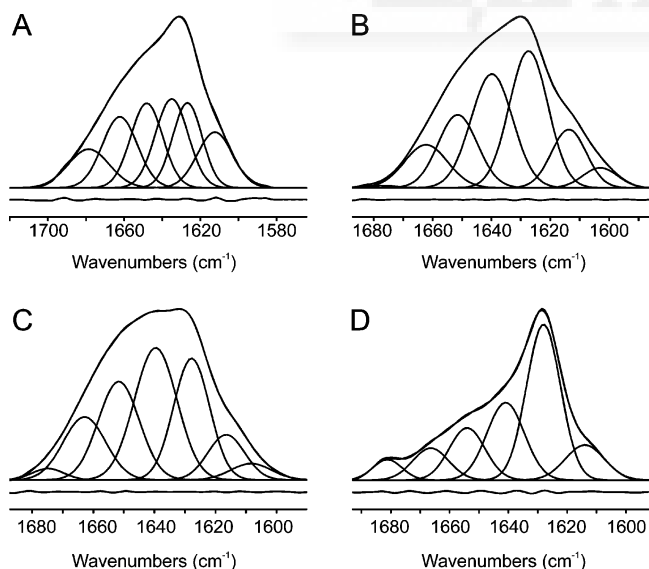


Figure 7. Amide I' band decomposition of the SARS-CoV PTM peptide in aqueous solution (A) and in the presence of DMPC (B), DMPG (C), and DMPA (D). The spectra were taken at 10 °C above the phospholipid T_m and 35 °C for the peptide in solution. The component bands, the original envelope, and the difference between the fitted curve and the original spectrum are shown.

ment, we have decomposed the Amide I' infrared band as described previously.⁶² Bands below 1620 cm⁻¹ are outside the range of frequencies usually observed for the secondary structure

elements of proteins, so they were not considered in the determination of the total area of the Amide I' band.^{58,62,68,69} The most significant difference between the secondary structure of the SARS-CoV PTM peptide in solution and in the presence of either DMPC or DMPG is that, in the latter cases, a significant decrease in β -sheet (36% and 26%, respectively, compared with 44% in solution) and β -turn (0% and 2%, respectively, compared with 13% in solution) structures were observed, concomitantly with an increase of α -helix and/or random coil (64% and 72%, respectively, compared with 43% in solution). However, in the presence of DMPA, a slight increase in α -helix and/or random coil (50%) was observed as well as a slight decrease in β -turn (5%) when compared with the peptide in solution. It should be recalled that two bands at 1626 and 1635 cm⁻¹ appeared for the protein in solution, but only one intense band at 1628 cm⁻¹ appeared for the peptide in the presence of DMPA. These results imply that the secondary structure of the SARS-CoV PTM peptide was affected by phospholipid composition.

Discussion

Viruses attach to cells through different mechanisms, but there is only one way to get into the host cell through the membrane: viral and host-cell membrane fusion supported by membrane fusion proteins. The membrane fusion protein of SARS-CoV is the envelope Spike glycoprotein, and it is thought, similarly to other Class I membrane fusion proteins, that several trimers of the S protein are capable of juxtaposing, destabilizing,

and merging the viral and cellular membranes so that a fusion pore is formed.^{1,3,5,25,40,52,70,71} Therefore, membrane fusion can be described as a succession of different steps, namely, apposition of membranes, hemifusion of the outer leaflets to form a stalk, fusion pore formation through merging of both bilayers at the stalk point, and, finally, fusion pore enlargement with full contents mixing.^{24,72} A lot of research on membrane fusion proteins point out that there are several regions within these proteins that are involved in the fusion process, and are decisive for membrane fusion to take place.^{34,37,39,40,50,52,58,71,73–75} Destabilization of the lipid bilayer and membrane fusion appears then to be the result of the binding and interaction of these segments with the biological membranes. However, little is known about how the complex series of protein/protein and protein/phospholipid interactions drive membrane apposition and how they overcome the energy barriers for membrane fusion. On the basis of our recent work,³⁹ we have selected a highly aromatic domain from the SARS-CoV pre-transmembrane sequence, also found in other Class I fusion membrane proteins, to carry out a biophysical study, aiming to elucidate the capacity of this region adjacent to the transmembrane domain of the protein, to interact and disrupt membranes with an approach based on different but complementary strategies.

The SARS-CoV PTM peptide studied in this work partitions with high affinity to model membranes having different phospholipid compositions. We and others have previously found similar binding affinities for other peptides pertaining to other membrane fusion proteins, as reported previously.^{56–58,62,76,77} However, the degree of partitioning of the SARS-CoV PTM peptide had no specificity for any particular lipid composition, as it has also been found for other peptides. This was further demonstrated by hydrophilic (acrylamide) and lipophilic (NS) probe quenching, suggesting that the SARS-CoV PTM peptide was effectively incorporated into the membranes but located at the membrane interface. The SARS-CoV PTM peptide was also capable of altering membrane stability, causing the release of fluorescent probes. However this effect was dependent on lipid composition and on the lipid/peptide molar ratio, with the highest effect being observed for liposomes containing EPC, Chol, and/or SM. Lower but significant values were observed for liposomes composed of EPC alone, those containing BPI and BPS, as well as those composed of the complex phospholipid mixtures LE and LPM. The observed effect should therefore be due primarily to hydrophobic interactions within the bilayer but not to the specific charge of the phospholipid headgroups. The binding to the surface and the modulation of the phospholipid biophysical properties, which take place when the peptide is bound to the membrane, i.e., partitioning into the membrane surface and perturbation of the bilayer architecture, could be related to the conformational changes that might occur during the activity of the SARS-CoV Spike protein. The induction of fusion by the SARS-CoV PTM peptide was also studied, and a similar result was obtained, since significant membrane fusion values were found in the presence of liposomes composed of negatively charged phospholipids as well as for the complex lipid mixtures studied (vide supra).

The differences we have found on the effect produced by the PTM peptide on leakage and fusion, i.e., higher aggregation and fusion values but lower leakage values in the presence of negatively charged phospholipids, and the opposite for the other types of phospholipids studied here, might indicate the possibility that negatively charged phospholipids (it should be recalled that type 1 and 2 lung pneumocytes are the most important cell targets of SARS-CoV, and their plasma mem-

branes contain PI and PS among other phospholipids) could play an important role and stimulate the first step in the fusion process, i.e., approximation and binding of the protein to the membrane, whereas the ensuing destabilization would be induced by the presence of other phospholipid types.

We have shown that the SARS-CoV PTM peptide is capable of affecting the steady-state fluorescence anisotropy of fluorescent probes located in the palisade structure of the membrane, since it decreased the cooperativity of the transition, as observed by both types of probes for the phospholipids DMPC, DMPG, and DMPS. Therefore, the peptide was able to decrease the mobility of the phospholipid acyl chains when compared to the pure phospholipid. However, some differences were found related to the anisotropy change below and above the T_m of the pure phospholipid, suggesting that the difference in charge between DMPC, DMPS, and DMPG could affect the effects of the incorporation of the peptide into the membrane. It is interesting to note that the peptide did not induce any significant effect on either the cooperativity or the anisotropy of DMPA, which, similarly to DMPG and DMPS, bears a negative charge in its headgroup. These data suggest, as commented above, that the SARS-CoV PTM peptide, although interacting with the membrane, should be located at the lipid–water interface.⁵⁷

The infrared spectra of the Amide I' region of the fully hydrated peptide changed with temperature, indicating a low stability of its conformation, where the β -sheet structure predominated. However, we have observed differences in the proportion of the different secondary elements when the peptide was incorporated into membranes of different phospholipid composition, since its conformation changed depending on phospholipid composition. Whereas the α -helix, β -sheet, and random percentages were similar in solution and in the presence of DMPA, they changed significantly in the presence of DMPC and DMPG, which would be in accordance with the fluorescence data commented above. Interestingly, the β -turn content decreased in the presence of all types of phospholipids. These data would suggest that the presence of different phospholipid headgroups would modulate the secondary structure of the peptide as it has been suggested for other peptides.^{57,58,62} It is interesting to note that the peptide in the presence of both DMPC and DMPG, but not in the presence of DMPA, changed its conformation concomitantly with the phospholipid gel-to-liquid-crystalline phase transition. The fact that peptide structure in DMPA remains unaltered is consistent with the effect observed in the TMA-DPH and DPH anisotropy experiments mentioned above. This effect suggests that, apart from a negative-charged phospholipid, the presence of a more sizable headgroup is important in the peptide–membrane interaction, perhaps permitting a greater hydration. It has been shown that, besides its fusogenic properties, the Trp-rich domain is also required for membrane fusion, perhaps by facilitating oligomerization of gp41³⁷ or stabilization of the spike trimer.⁷⁸ Membrane fusion is an energy-costing event that involves destabilization of the bilayer and dehydration of the interfacial regions.^{23,24,79} The structural changes that take place when the SARS-CoV PTM peptide binds to the membrane could be indicative of the conformational change that takes place during the metastable (native) to stable (fusogenic) conformational changes of the SARS S glycoprotein following binding of the SARS envelope glycoprotein to its receptors. In the case of the peptide in DMPG, this effect is shown in the IR experiments. We can observe that a change from β -sheet structures or self-aggregated peptides to a mixture of unordered and helical structures takes place at the same temperature of DMPG. This change might be related to a

possible role of the peptide in the fusion process. In the first steps of fusion, the peptide would be able to facilitate the oligomerization/trimerization of the spike protein, and, subsequently, after membrane interaction, the conformational change would be an energy supplier to assist in the fusion process. This is consistent with the results obtained in the fusion and aggregation assays in which the SARS-CoV PTM peptide was more effective in promoting fusion in negatively charged membranes.

Conclusions

The SARS-CoV PTM peptide adopts different conformations when bound to membranes of different compositions, altering the physical properties of the phospholipid bilayer and inducing a very efficient release of trapped probes. Therefore, this region of the SARS Spike glycoprotein should play a significant role in the fusion mechanism, and, at the same time, it could be considered that this region of the protein during and/or after the fusion process could interact with other membranotropic regions and therefore might be essential for the assistance and enhancement of the viral and cell fusion process.

Abbreviations

16NS: 16-doxyl-stearic acid; 5NS: 5-doxyl-stearic acid; BPI: bovine brain L- α -phosphatidylinositol; BPS: bovine brain phosphatidylserine; CF: 5-carboxyfluorescein; Chol: cholesterol; CoV: coronavirus; DMPA: 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycerophosphatidic acid; DMPC: 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycerophosphatidylcholine; DMPG: 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycerophosphatidylglycerol; DMPS: 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycerophosphatidylserine; DPH: 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene; EPC: egg yolk L- α -phosphatidylcholine; EPG: egg yolk L- α -phosphatidylglycerol; FP: fusion peptide; FTIR: Fourier-transform infrared spectroscopy; HIV-1: human immunodeficiency virus type 1; HR1: heptad repeat region 1; HR2: heptad repeat region 2; LE: lung extract; LPM: lung pneumocytes membrane; LUV: large unilamellar vesicles; MLV: multilamellar vesicles; NBD-PE: *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycerophosphoethanolamine; POPE: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerophosphoethanolamine; PTM: pre-transmembrane domain; RhB-PE: lissamine rhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycerophosphoethanolamine; SARS: severe acute respiratory syndrome; SM: egg sphingomyelin; T_m : temperature of the gel-to-liquid-crystalline phase transition; TM: transmembrane domain; TMA-DPH: 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene; TPE: egg trans-esterified L- α -phosphatidylethanolamine.

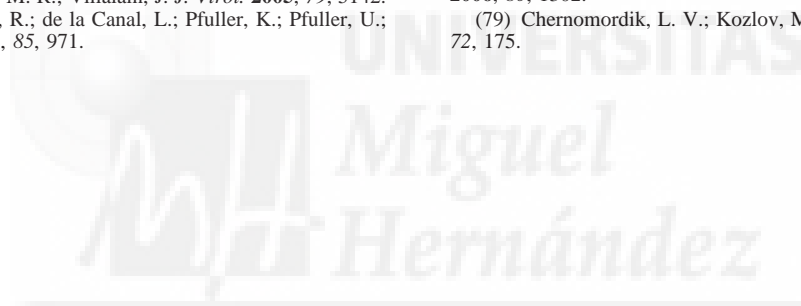
Acknowledgment. This work was supported by Grant BFU2005-00186-BMC (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) to J.V. M.R.M. and A.B. are recipients of a pre-doctoral fellowship from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain. A.J.P. and J.G. are recipients of pre-doctoral fellowships from the Autonomous Government of the Valencian Community, Spain.

References and Notes

- (1) Drosten, C.; Chiu, L. L.; Panning, M.; Leong, H. N.; Preiser, W.; Tam, J. S.; Gunther, S.; Kramme, S.; Emmerich, P.; Ng, W. L.; Schmitz, H.; Koay, E. S. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 2043.
- (2) Peiris, J. S.; Lai, S. T.; Poon, L. L.; Guan, Y.; Yam, L. Y.; Lim, W.; Nicholls, J.; Yee, W. K.; Yan, W. W.; Cheung, M. T.; Cheng, V. C.; Chan, K. H.; Tsang, D. N.; Yung, R. W.; Ng, T. K.; Yuen, K. Y. *Lancet* **2003**, *361*, 1319.

- (3) Ksiazek, T. G.; Erdman, D.; Goldsmith, C. S.; Zaki, S. R.; Peret, T.; Emery, S.; Tong, S.; Urbani, C.; Comer, J. A.; Lim, W.; Rollin, P. E.; Dowell, S. F.; Ling, A. E.; Humphrey, C. D.; Shieh, W. J.; Guarnier, J.; Paddock, C. D.; Rota, P.; Fields, B.; DeRisi, J.; Yang, J. Y.; Cox, N.; Hughes, J. M.; LeDuc, J. W.; Bellini, W. J.; Anderson, L. J. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1953.
- (4) Poutanen, S. M.; Low, D. E.; Henry, B.; Finkelstein, S.; Rose, D.; Green, K.; Tellier, R.; Draker, R.; Adachi, D.; Ayers, M.; Chan, A. K.; Skowronski, D. M.; Salit, I.; Simor, A. E.; Slutsky, A. S.; Doyle, P. W.; Krajden, M.; Petric, M.; Brunham, R. C.; McGeer, A. J. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1995.
- (5) Yeung, K. S.; Yamanaka, G. A.; Meanwell, N. A. *Med. Res. Rev.* **2006**, *26*, 414.
- (6) Li, W.; Moore, M. J.; Vasilieva, N.; Sui, J.; Wong, S. K.; Berne, M. A.; Somasundaran, M.; Sullivan, J. L.; Luzuriaga, K.; Greenough, T. C.; Choe, H.; Farzan, M. *Nature* **2003**, *426*, 450.
- (7) Masters, P. S. *Adv. Virus Res.* **2006**, *66*, 193.
- (8) Babcock, G. J.; Esshaki, D. J.; Thomas, W. D., Jr.; Ambrosino, D. M. *J. Virol.* **2004**, *78*, 4552.
- (9) Wong, S. K.; Li, W.; Moore, M. J.; Choe, H.; Farzan, M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 3197.
- (10) Rota, P. A.; Oberste, M. S.; Monroe, S. S.; Nix, W. A.; Campagnoli, R.; Icenogle, J. P.; Penaranda, S.; Bankamp, B.; Maher, K.; Chen, M. H.; Tong, S.; Tamin, A.; Lowe, L.; Frace, M.; DeRisi, J. L.; Chen, Q.; Wang, D.; Erdman, D. D.; Peret, T. C.; Burns, C.; Ksiazek, T. G.; Rollin, P. E.; Sanchez, A.; Liffick, S.; Holloway, B.; Limor, J.; McCaustland, K.; Olsen-Rasmussen, M.; Fouchier, R.; Gunther, S.; Osterhaus, A. D.; Drosten, C.; Pallansch, M. A.; Anderson, L. J.; Bellini, W. J. *Science* **2003**, *300*, 1394.
- (11) Xiao, X.; Chakraborti, S.; Dimitrov, A. S.; Gramatikoff, K.; Dimitrov, D. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *312*, 1159.
- (12) Xu, Y.; Zhu, J.; Liu, Y.; Lou, Z.; Yuan, F.; Liu, Y.; Cole, D. K.; Ni, L.; Su, N.; Qin, L.; Li, X.; Bai, Z.; Bell, J. I.; Pang, H.; Tien, P.; Gao, G. F.; Rao, Z. *Biochemistry* **2004**, *43*, 14064.
- (13) Zhu, J.; Xiao, G.; Xu, Y.; Yuan, F.; Zheng, C.; Liu, Y.; Yan, H.; Cole, D. K.; Bell, J. I.; Rao, Z.; Tien, P.; Gao, G. F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 283.
- (14) Triplet, B.; Howard, M. W.; Jobling, M.; Holmes, R. K.; Holmes, K. V.; Hodges, R. S. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 20836.
- (15) Liu, S.; Xiao, G.; Chen, Y.; He, Y.; Niu, J.; Escalante, C. R.; Xiong, H.; Farmer, J.; Debnath, A. K.; Tien, P.; Jiang, S. *Lancet* **2004**, *363*, 938.
- (16) Ingallinella, P.; Bianchi, E.; Finotto, M.; Cantoni, G.; Eckert, D. M.; Supekar, V. M.; Bruckmann, C.; Carfi, A.; Pessi, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8709.
- (17) Bosch, B. J.; van der Zee, R.; de Haan, C. A.; Rottier, P. J. *J. Virol.* **2003**, *77*, 8801.
- (18) Bosch, B. J.; Martina, B. E.; Van Der Zee, R.; Lepault, J.; Haijema, B. J.; Versluis, C.; Heck, A. J.; De Groot, R.; Osterhaus, A. D.; Rottier, P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8455.
- (19) Gallaher, W. R. *Cell* **1996**, *85*, 477.
- (20) Chambers, P.; Pringle, C. R.; Easton, A. J. *J. Gen. Virol.* **1990**, *71* (Pt 12), 3075.
- (21) Gallaher, W. R.; Ball, J. M.; Garry, R. F.; Griffin, M. C.; Montelaro, R. C. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1989**, *5*, 431.
- (22) Wilson, I. A.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Nature* **1981**, *289*, 366.
- (23) Chernomordik, L. V.; Zimmerberg, J.; Kozlov, M. M. *J. Cell Biol.* **2006**, *175*, 201.
- (24) Chernomordik, L. V.; Kozlov, M. M. *Cell* **2005**, *123*, 375.
- (25) Blumenthal, R.; Clague, M. J.; Durell, S. R.; Epand, R. M. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 53.
- (26) Earp, L. J.; Delos, S. E.; Park, H. E.; White, J. M. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2005**, *285*, 25.
- (27) Peisajovich, S. G.; Shai, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1614*, 122.
- (28) Suarez, T.; Nir, S.; Goni, F. M.; Saez-Cirion, A.; Nieva, J. L. *FEBS Lett.* **2000**, *477*, 145.
- (29) Saez-Cirion, A.; Gomara, M. J.; Agirre, A.; Nieva, J. L. *FEBS Lett.* **2003**, *533*, 47.
- (30) Salzwedel, K.; West, J. T.; Hunter, E. *J. Virol.* **1999**, *73*, 2469.
- (31) Munoz-Barroso, I.; Salzwedel, K.; Hunter, E.; Blumenthal, R. J. *J. Virol.* **1999**, *73*, 6089.
- (32) Tong, S.; Yi, F.; Martin, A.; Yao, Q.; Li, M.; Compans, R. W. *Virology* **2001**, *280*, 52.
- (33) Zhou, J.; Dutch, R. E.; Lamb, R. A. *Virology* **1997**, *239*, 327.
- (34) Moreno, M. R.; Pascual, R.; Villalain, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1661*, 97.
- (35) Suarez, T.; Gallaher, W. R.; Agirre, A.; Goni, F. M.; Nieva, J. L. *J. Virol.* **2000**, *74*, 8038.
- (36) Saez-Cirion, A.; Nir, S.; Lorizate, M.; Agirre, A.; Cruz, A.; Perez-Gil, J.; Nieva, J. L. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21776.
- (37) Saez-Cirion, A.; Arrondo, J. L.; Gomara, M. J.; Lorizate, M.; Iloro, I.; Melikyan, G.; Nieva, J. L. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3769.
- (38) Epand, R. F.; Sayer, B. G.; Epand, R. M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5525.

- (39) Guillen, J.; Perez-Berna, A. J.; Moreno, M. R.; Villalain, J. *J. Virol.* **2005**, *79*, 1743.
- (40) Sainz, B., Jr.; Rausch, J. M.; Gallaher, W. R.; Garry, R. F.; Wimley, W. C. *Biochemistry* **2005**, *44*, 947.
- (41) Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Chapman, D. *Biochemistry* **1993**, *32*, 389.
- (42) Zhang, Y. P.; Lewis, R. N.; Hodges, R. S.; McElhaney, R. N. *Biochemistry* **1992**, *31*, 11572.
- (43) Muller, C.; Kukul, S.; Schneweis, K. E.; Bauer, R. *Clin. Exp. Immunol.* **1994**, *97*, 367.
- (44) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911.
- (45) Mayer, L. D.; Bally, M. B.; Hope, M. J.; Cullis, P. R. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *40*, 333.
- (46) Palestini, P.; Calvi, C.; Conforti, E.; Botto, L.; Fenoglio, C.; Miserocchi, G. *Am. J. Physiol.: Lung Cell Mol. Physiol.* **2002**, *282*, L1382.
- (47) Böttcher, C. S. F.; Van Gent, C. M.; Fries, C. *Anal. Chim. Acta* **1961**, *1061*, 203.
- (48) Edelhoch, H. *Biochemistry* **1967**, *6*, 1948.
- (49) Bernabeu, A.; Guillen, J.; Perez-Berna, A. J.; Moreno, M. R.; Villalain, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 1659.
- (50) Moreno, M. R.; Giudici, M.; Villalain, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 111.
- (51) Meers, P.; Ali, S.; Erukulla, R.; Janoff, A. S. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1467*, 227.
- (52) Sainz, B., Jr.; Rausch, J. M.; Gallaher, W. R.; Garry, R. F.; Wimley, W. C. *J. Virol.* **2005**, *79*, 7195.
- (53) Eftink, M. R.; Ghiron, C. A. *Biochemistry* **1977**, *16*, 5546.
- (54) Castanho, M.; Prieto, M. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 155.
- (55) Wardlaw, J. R.; Sawyer, W. H.; Ghiggino, K. P. *FEBS Lett.* **1987**, *223*, 20.
- (56) Santos, N. C.; Prieto, M.; Castanho, M. A. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8674.
- (57) Contreras, L. M.; Aranda, F. J.; Gavilanes, F.; Gonzalez-Ros, J. M.; Villalain, J. *Biochemistry* **2001**, *40*, 3196.
- (58) Pascual, R.; Moreno, M. R.; Villalain, J. *J. Virol.* **2005**, *79*, 5142.
- (59) Giudici, M.; Pascual, R.; de la Canal, L.; Pfuller, K.; Pfuller, U.; Villalain, J. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 971.
- (60) Kauppinen, J. K.; Moffatt, D. J.; Mantsch, H. H.; Cameron, D. G. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1454.
- (61) Cameron, D. G.; Moffatt, D. J. *J. Test. Eval.* **1984**, *12*, 78.
- (62) Pascual, R.; Contreras, M.; Fedorov, A.; Prieto, M.; Villalain, J. *Biochemistry* **2005**, *44*, 14275.
- (63) Struck, D. K.; Hoekstra, D.; Pagano, R. E. *Biochemistry* **1981**, *20*, 4093.
- (64) Lentz, B. R. *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 99.
- (65) Davenport, L.; Dale, R. E.; Bisby, R. H.; Cundall, R. B. *Biochemistry* **1985**, *24*, 4097.
- (66) Pebay-Peyroula, E.; Dufourc, E. J.; Szabo, A. G. *Biophys. Chem.* **1994**, *53*, 45.
- (67) Byler, D. M.; Susi, H. *Biopolymers* **1986**, *25*, 469.
- (68) Arrondo, J. L.; Goni, F. M. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1999**, *72*, 367.
- (69) Roque, A.; Iloro, I.; Ponte, I.; Arrondo, J. L.; Suau, P. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32141.
- (70) Hofmann, H.; Pohlmann, S. *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 466.
- (71) Sainz, B., Jr.; Mossel, E. C.; Gallaher, W. R.; Wimley, W. C.; Peters, C. J.; Wilson, R. B.; Garry, R. F. *Virus Res.* **2006**, *120*, 146.
- (72) Zimmerberg, J.; Chernomordik, L. V. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *38*, 197.
- (73) Perez-Berna, A. J.; Moreno, M. R.; Guillen, J.; Bernabeu, A.; Villalain, J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 3755.
- (74) Lorizate, M.; de la Arada, I.; Huarte, N.; Sanchez-Martinez, S.; de la Torre, B. G.; Andreu, D.; Arrondo, J. L.; Nieva, J. L. *Biochemistry* **2006**, *45*, 14337.
- (75) Gomara, M. J.; Mora, P.; Mingarro, I.; Nieva, J. L. *FEBS Lett.* **2004**, *569*, 261.
- (76) Korazim, O.; Sackett, K.; Shai, Y. *J. Mol. Biol.* **2006**, *364*, 1103.
- (77) Rabenstein, M.; Shin, Y. K. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13390.
- (78) Broer, R.; Boson, B.; Spaan, W.; Cosset, F. L.; Corver, J. *J. Virol.* **2006**, *80*, 1302.
- (79) Chernomordik, L. V.; Kozlov, M. M. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 175.





Structural and dynamic characterization of the interaction of the putative fusion peptide of the S2 SARS-CoV virus protein with lipid membranes.

Jaime Guillén¹, Rodrigo F. M. de Almeida^{2,3}, Manuel Prieto², and José Villalaín¹

¹ *Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad "Miguel Hernández", Elche-Alicante, Spain.*

² *Centro de Química-Física Molecular, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal.*

³ *Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências de Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.*

J. Phys. Chem. B, 2008, In press.

Structural and dynamic characterization of the interaction of the putative fusion peptide of the S2 SARS-CoV virus protein with lipid membranes.

Jaime Guillén¹, Rodrigo F.M. de Almeida^{2,3}, Manuel Prieto² and José Villalain¹

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, E-03202, Elche-Alicante, Spain, ² Centro de Química-Física Molecular, Instituto Superior Técnico, 1049-001 Lisboa, Portugal and ³ Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 1749-016 Lisboa, Portugal.

RUNNING TITLE

Characterization of the SARS-CoV putative fusion peptide

SUBDIVISION

B2 Surfactants, Membranes

* Corresponding author:

Dr. José Villalain

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad “Miguel Hernández”

E-03202 Elche-Alicante, Spain

Tel +34 966 658 762

Fax +34 966 658 758

E-mail: jvillalain@umh.es

ABBREVIATIONS

ANTS	8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid
16NS	16-Doxyl-stearic acid
5NS	5-Doxyl-stearic acid
BPI	Bovine liver L- α -phosphatidylinositol
BPS	Bovine brain L- α -phosphatidylserine
CD	Circular dichroism
CF	5-Carboxyfluorescein
Chol	Cholesterol
CoV	Coronavirus
di-8-ANEPPS	4-(2-(6-(Diocetyl-amino)-2-naphthalenyl)ethenyl)-1-(3-sulfopropyl)-pyridinium inner salt
DMPA	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphatidic acid
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphatidylcholine
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphatidylglycerol
DMPS	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphatidylserine
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene
DPX	p-Xylene-bis-pyridinium bromide
EPA	Egg L- α -phosphatidic acid
EPC	Egg L- α -phosphatidylcholine
EPE	Egg trans-sterified L- α -phosphatidylethanolamine
EPG	Egg L- α -phosphatidylglycerol
ESM	Egg sphingomyelin

FP	Fusion peptide
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HR	Heptad repeat region
LPC	Lysophosphatidylcholine
LUV	Large unilamellar vesicles
MLV	Multilamellar vesicles
NBD-PE	<i>N</i> -(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
PTM	Pre-transmembrane domain
RET	Resonance energy transfer
RhB-PE	<i>N</i> -Lissamine rhodamine B-1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
SARS	Severe acute respiratory syndrome
SARS _{FP}	Putative fusion peptide of SARS
T _m	Main transition temperature
TM	Transmembrane domain

ABSTRACT

The SARS coronavirus (SARS-CoV) envelope spike (S) glycoprotein, a Class I viral fusion protein, is the responsible for the fusion between the membranes of the virus and the target cell. In the present work we report a study of the binding and interaction with model membranes of a peptide pertaining to the putative fusion domain of SARS-CoV, SARS_{FP}, as well as the structural changes which take place in both the phospholipid and the peptide molecules upon this interaction. From fluorescence and infrared spectroscopies, the peptide ability to induce membrane leakage, aggregation and fusion, as well as its affinity towards specific phospholipids, was assessed. We demonstrate that SARS_{FP} strongly partitions into phospholipid membranes, more specifically with those containing negatively-charged phospholipids, increasing the water penetration depth and displaying membrane-activity modulated by the lipid composition of the membrane. Interestingly, peptide organization is different depending if SARS_{FP} is in water or bound to the membrane. These data suggest that SARS_{FP} could be involved in the merging of the viral and target cell membranes by perturbing the membrane outer leaflet phospholipids and specifically interacting with negatively-charged phospholipids located in the inner leaflet.

KEYWORDS

SARS; membrane fusion; spike glycoprotein; fusion peptide; peptide-membrane interaction, virus-host cell interactions.

INTRODUCTION

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is an atypical pneumonia caused by a newly discovered virus denominated SARS coronavirus (SARS-CoV). Phylogenetic analysis of the amino acid sequence and complete sequencing of this coronavirus^{1,2} has shown to be distinct from previously characterized groups of coronaviruses; SARS-CoV is distantly related to coronavirus group 2 and is therefore classified as a new subfamily within this group. While most coronavirus infections are mild, mortality rate for SARS-CoV is commonly referred to be about 10% but increase to greater than 50% in persons older than age 60. At present there is no vaccine available against any human coronavirus infection. Although SARS has been successfully restrained, re-emergence from animal reservoirs is still a potential risk for future recurrences, which is supported by continual reports which find SARS-CoV in small animals, such as civets, raccoon dogs and bats³. Furthermore, evidence of SARS-CoV infection has also been observed in many other marketplace species in China, including cat, red fox, and the Chinese ferret badger.

Coronaviruses are a diverse group of enveloped, positive-stranded RNA viruses, with 3-4 proteins embedded in the envelope, that cause respiratory and enteric diseases in humans and other animals. SARS-CoV infection, similarly to other envelope viruses, is achieved through fusion of the lipid bilayer of the viral envelope with the host cell membrane. The spike glycoprotein S, responsible for the characteristic spikes of the SARS-CoV, is a surface glycoprotein that mediates viral entry by binding to the cellular receptors ACE2 and CD209L^{4,5} and induces membrane fusion. In some strains, protein S is cleaved by a protease to yield two non-covalently associated subunits, S1 and S2 (Figure 1), but cleavage is not an absolute requirement for the mechanism of fusion⁶. The receptor binding domain, localized in domain

S1, defines the host range of the virus, while S2 is the responsible for the fusion between the viral and cellular membranes^{2,7}. S2 contains two highly conserved heptad repeat regions (HR1 and HR2, see Figure 1A)⁸⁻¹⁰, similarly to other viral fusion proteins, including HIV-1 gp41, influenza hemagglutinin HA2, Ebola virus glycoprotein and paramyxovirus F protein^{11,12}. All of them have been classified as Class I transmembrane glycoproteins and are displayed on the surface of the viral membrane as oligomers. Class I viral proteins also contain a hydrophobic region denominated as the fusion peptide (FP) and other hydrophobic region immediately adjacent to the membrane-spanning domain denominated as the pre-transmembrane domain (PTM). The transmembrane region and cytoplasmic tail of SARS CoV S protein is only 52 amino acids long, which is the shortest length of all known coronavirus S proteins. Although the exact mechanism by which SARS-CoV enters the host cell has not been elucidated, it is most likely similar to other coronaviruses. Upon binding to the receptor at the host cell membrane, the fusion protein will be induced into the fusogenic intermediate state with a significant conformation change. This change is transmitted from S1 to S2 that causes the fusion peptide to be released from the interior of the protein and inserted into the target cell bilayer, exposing the S2 HR1 and HR2 regions. The fusion peptide is thought to be involved in clustering, orientation and target membrane binding of trimeric spikes. This “meta-stable” fusion intermediate state is followed by a low energy post-fusion state that entails the formation of a six-helix bundle, where HR1 helices fold into a central, coiled-coil core in a parallel orientation, and the three HR2 helices in an antiparallel orientation, packed onto the grooves of HR1 through hydrophobic interactions^{10,13-18}. This fusion-active core structure brings the fusion peptide and transmembrane anchor together, driving the viral and target-cell membranes into close proximity, resulting in fusion between the membranes and formation of fusion pores, which allow the virus genome to enter the target cell.

Membrane fusion proteins share common motifs, one of them the “fusion peptide”, a short segment of hydrophobic residues, rich in Gly residues and essential for fusion. The fusion peptides interact with and insert into target membranes¹⁹ since this region represents a surface patch with high bilayer-to-water transfer free-energy values (Figure 1B). Fusion peptides also participate in inducing lipid rearrangements giving place to hemifusion and pore formation²⁰⁻²² and are also involved in pore enlargement. The fusion peptide does not function as an isolated unit and in addition it tends to self-associate in membranes in organized complexes in which several fusion peptide segments can act in a coordinated fashion. There are several pieces of evidence for the crucial role of fusion peptides in the fusion process. However, accurate information may be difficult to obtain from the complex system of an intact virus or a whole cell. Therefore, synthetic peptides corresponding to the putative fusion peptides may prove to be highly useful in determining structural characteristics, to determine the way fusion peptides may interact with, penetrate into and destabilize a lipid bilayer and study the influence of different lipid requirements on fusion by modulating the composition of the peptide-interacting membranes. While much progress has been made in understanding the implication of fusion peptides of influenza, HIV and other viruses in the membrane fusion process, available data concerning the fusion peptide of coronaviruses, particularly in the case of SARS-CoV, are scarce. In the present work we report on the determination of the secondary structure and the interaction with model membranes of a peptide pertaining to the fusion domain of SARS-CoV (SARS_{FP}). The structural and dynamical changes which take place in both the peptide and the phospholipid molecules induced by interaction with the lipid bilayer are characterized through a series of complementary experiments. Moreover, we show that SARS_{FP} strongly partitions into phospholipids membranes and organizes differently in lipid environments, increasing the water penetration depth and displaying membrane-activity modulated by the lipid composition of the

membrane, suggesting that the SARS_{FP} could be involved in the merging of the viral and target cell membranes.



EXPERIMENTAL METHODS.

Materials and reagents. A 19-residue peptide pertaining to the S2 domain of SARS-CoV (⁷⁷⁰MWKTPTLKYFGGFNFSQIL⁷⁸⁸ with N-terminal acetylation and C-terminal amidation) was obtained from Genemed Synthesis, San Francisco, CA. The peptide was purified by reverse-phase HPLC (Vydac C-8 column, 250 x 4.6 mm, flow rate 1 ml/min, solvent A, 0.1% trifluoroacetic acid, solvent B, 99.9 acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) to better than 95% purity, and its composition and molecular mass were confirmed by amino acid analysis and mass spectroscopy. Since trifluoroacetate has a strong infrared absorbance at approximately 1,673 cm⁻¹, which interferes with the characterization of the peptide amide I band²³, residual trifluoroacetic acid, used both in peptide synthesis and in the high-performance liquid chromatography mobile phase, was removed by several lyophilization-solubilization cycles in 10 mM HCl. Egg phosphatidylCholine (EPC), egg phosphatidylglycerol (EPG), egg phosphatidic acid (EPA), egg sphingomyelin (ESM), bovine brain phosphatidylserine (BPS), egg transferified phosphatidylethanolamine (EPE), bovine liver phosphatidylinositol (BPI), 1,2-dimyristoylphosphatidylCholine (DMPC), 1,2-dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG), 1,2-dimyristoylphosphatidylserine (DMPS), 1,2-dimyristoylphosphatidic acid (DMPA), Chol (Chol), N-Lissamine rhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (RhB-PE) and N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (NBD-PE) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). 5-Carboxyfluorescein (CF), (>95% by HPLC), 5-doxyyl-stearic acid (5NS), 16-doxyyl-stearic acid (16NS), 4-(2-(6-(Diocetyl-amino)-2-naphthalenyl)ethenyl)-1-(3-sulfopropyl)-pyridinium inner salt (di-8-ANEPPS), sodium dithionite, deuterium oxide (99.9% by atom), Triton X-100, EDTA, and HEPES were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, ES-EU). 8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS), p-Xylene-bis-pyridinium bromide (DPX) and 1,6-Diphenyl-1,3,5-

hexatriene (DPH) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). All other reagents used were of analytical grade from Merck (Darmstadt, GER-EU). Water was deionized, twice-distilled and passed through a Milli-Q equipment (Millipore Ibérica, Madrid, ES-EU) to a resistivity higher than 18 MΩ cm.

Liposome preparation. Liposomes were prepared as described previously²⁴⁻²⁶. The phospholipid and peptide concentration was measured by methods described previously^{27,28}.

Leakage and phospholipid-mixing measurements. Phospholipid mixing was performed as described previously²⁴⁻²⁶.

Kinetics of leakage and fusion. The kinetics of leakage and fusion was analyzed from the parameters L_{\max} and τ (see Table II) obtained by fitting an exponential function to the experimental time course curves. To obtain a good fitting it was necessary to use of a double exponential rate equation. Experimental leakage time course curves were described by the relationship $L = L_1((1 - \exp(-t/\tau_1)) + L_2((1 - \exp(-t/\tau_2)))$, where L_1 and L_2 represent the maximum leakage, t is the time after the addition of the peptide, and τ_1 and τ_2 are time constants. The average rate constants $\langle\tau\rangle$ were calculated according to $\langle\tau\rangle = a_1\tau_1 + a_2\tau_2$, where a_1 and a_2 are the normalized fractional leakage component, $a_i = L_i / L_{\max}$.

Liposome aggregation. LUVs with a mean diameter of 0.2 μm were prepared in buffer containing 10 mM Tris, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA. Peptide-induced vesicle aggregation was detected by monitoring the optical density at 405 nm on a 96 well Anthos Spectrometer. All measurements were performed at room temperature on microtiter plates each well containing a

final volume of 150 μ l. The lipid concentration was 0.27 mM in all experiments and the measured optical density was corrected for dilution upon peptide addition.

Peptide binding. Peptide partitioning into membranes was evaluated by the enhancement of the tryptophan fluorescence by successive additions of small volumes of LUVs to the peptide sample (3.2×10^{-5} M peptide concentration). For details see refs. ^{24,25}.

Fluorescence quenching of Trp emission by water-soluble and lipophilic probes and steady-state fluorescence anisotropy. Fluorescence quenching and anisotropy studies were performed essentially as described previously ²⁴⁻²⁶.

Measurement of the membrane dipole potential. Aliquots containing the appropriate amount of lipid in chloroform-methanol (2:1 v/v) and di-8-ANEPPS were placed in a test tube to obtain a probe/lipid molar ratio of 1/100 and LUVs with a mean diameter of 0.1 μ m were prepared as described previously. Steady-state fluorescence measurements were recorded with a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter. For details see ref. ²⁶.

Time-resolved fluorescence spectroscopy. Fluorescence intensity and anisotropy decays were obtained by the single-photon timing technique. For Trp, excitation was made at $\lambda = 295$ nm with a dye laser of Rhodamine 6G ²⁹. For DPH excitation at 375 nm, a solid state Ti:sapphire laser was employed. The experimental layout is described ³⁰. The emission wavelength was (350 nm for Trp and 430 nm for DPH). The time-scales ranged from 7.5 to 14.0 ps/channel for Trp and from 20.0 to 57.6 ps/channel for DPH (total time channels 1024). The experimental fluorescence intensity and anisotropy decays were analyzed using the TRFA software (Scientific Software Technologies Center, Minsk, Belarus). For other details on the fluorescence intensity

decay analysis and average fluorescence lifetime calculations see ^{29,30}. For other details on the time-resolved anisotropy measurements and analysis see ^{31,32}.

Infrared Spectroscopy. Aliquots containing the appropriate amount of lipid in chloroform/methanol (2:1, v/v) were placed in a test tube containing 200 µg of dried lyophilized peptide. After vortexing, the solvents were removed by evaporation under a stream of O₂-free nitrogen, and finally, traces of solvents were eliminated under vacuum in the dark for more than three hours. The samples were hydrated in 200 µl of D₂O buffer containing 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4 and incubated at 10°C above the phase transition temperature (T_m) of the phospholipid mixture with intermittent vortexing for 45 min to hydrate the samples and obtain multilamellar vesicles (MLV). The spectra were obtained and analyzed as described previously ^{33,34}.



RESULTS

The SARS-CoV spike glycoprotein consists of an extracellular domain, a TM domain, and an intracellular domain (Figure 1A) and it can be classified as a Class I viral fusion protein. It is also known that, apart from the FP, other regions of viral fusion proteins bind and interact with membranes and experience conformational changes which all together combine to make possible the fusion of the viral and cell membranes^{19,35}. Recently we have shown the existence of different membranotropic regions of the SARS spike glycoprotein by using a library of 16/18-mer peptides encompassing the full sequence of the protein³⁶, which might be important, not only for modulating membrane binding and interaction, but also for protein-protein interaction. In order to detect surfaces along the SARS spike glycoprotein which might be identified as membrane partitioning and/or membrane interacting-ability zones, we have plotted the average surface hydrophobic moment, hydrophobicity and interfaciality versus the amino-acid sequence supposing it adopts an α -helical structure along the whole sequence, giving us a depiction of the potential surface zones that could be possibly implicated in membranotropic action (Figure 1B; see also³⁶). These patches of positive hydrophobicity and interfaciality along the surface of the protein could favor the interaction with other similar patches along the same or other proteins as well as with the surface of the membrane. One of these membranotropic regions (Figure 1) has been proposed to be the putative fusion peptide of the SARS spike glycoprotein, SARS_{FP}. Since SARS_{FP} could be important in the membrane fusion process, we present here the results of the study of the interaction of SARS_{FP} with model membranes.

SARS_{FP} membrane binding and interaction

The intensity of the fluorescence emission of a Trp residue increases when the amino acid is in a hydrophobic environment such as a phospholipid membrane, and together with an increase in the quantum yield, the maximal spectral position shifts toward shorter wavelengths³⁴. The increase in fluorescence emission intensity of the Trp residue of the SARS_{FP} peptide as a function of the increasing lipid concentration is shown in Figure 2A. From data fitting, partition coefficients, K_p , were obtained for the different phospholipid compositions (summarized in Table I). Large K_p values (in the range 10^6) were obtained for negatively charged phospholipids-containing bilayers, even at increasing ionic strengths (Figure 2A), showing that the peptide has a strong preference for the membrane as compared to the aqueous environment. These results were further corroborated by the displacement in the emission frequency maximum of Trp in the presence of phospholipid LUVs. In the case of the SARS_{FP} peptide, the maximum of the fluorescence emission spectra decreased up to 7-8 nm upon addition of negatively charged vesicles and 0–3 nm when the peptide was titrated with neutral vesicles (Table I), suggesting a more hydrophobic (low-polarity) environment surrounding the tryptophan residue in the presence of negatively charged phospholipids than in the presence of zwitterionic phospholipids. This nontrivial effect will be rationalized in the Discussion section. Since membrane apposition is a necessary requisite before membrane fusion can occur³⁷, the ability of the SARS_{FP} peptide to induce vesicle aggregation was tested in order to investigate whether this property correlated with the peptide-membrane binding and leakage assays. The ability of the peptide to induce vesicle aggregation was monitored through the increment in optical density as a function of the peptide/lipid ratio as shown in Figure 2B. It can be observed that the effect of the SARS_{FP} peptide is larger in liposomes containing negatively charged phospholipids than on zwitterionic ones, in a similar way to the fluorescence data shown above. The SARS_{FP} peptide has a positive net formal charge of +2, so that an electrostatic effect might be the reason to observe high K_p values and also significant vesicle aggregation for compositions containing negatively charged

phospholipids. However, it is not only the electrostatic attraction that is playing a role, since an increase in the ionic strength does not decrease the partition coefficient, which it would in case of a purely electrostatic interaction. In addition to electrostatic effects, hydrophobic interactions also play an important role, which is relevant because the outer leaflet of the target membrane for the virus is mainly zwitterionic.

Another way of evaluating the interaction of the peptide with the membrane is by determining the fluorescence intensity decay of the Trp residue. The decay of Trp is usually complex since more than two exponentials are required for a good description, and from this complexity, subtle alterations undergone by the peptide upon membrane insertion can be detected. In Table II the parameters describing the SARS_{FP} fluorescence decay, the lifetime-weighted quantum yield and the average fluorescence lifetime are shown in buffer at different temperatures, and in the presence of different lipid mixtures at 25°C. In all systems the fluorescence decay was described by the sum of three exponentials, with lifetime components typical of Trp-containing peptides. In buffer, and as expected, the lifetime decreases with increasing temperature, because the non-radiative decay processes become more effective. However, from 25°C to 15°C, there are changes in the sequence of pre-exponentials (not verified between 25°C and 50°C), whereas the lifetime-weighted quantum yield and mean lifetime show very modest changes, suggesting the existence of a structural alteration between 15°C and 25°C. In the presence of different lipid mixtures, there are small but appreciable changes in the lifetime parameters. In general, the lifetime-weighted quantum yield is increased as compared to the value in buffer at the same temperature, except for the EPC/Chol system. In the case of pure lipid vesicles (EPC and EPG) and in the EPC/BPS/Chol mixture, the normalized pre-exponentials show no drastic changes relatively to the fluorescence decay in water at 25°C, suggesting that there are no strong structural alterations of the peptide in the vicinity of the Trp residue upon

membrane incorporation. In the case of the EPC/Chol mixture, the changes are more pronounced, namely, the pre-exponential of the long component is significantly reduced, with a concomitant increase in the pre-exponential of the short one. In all other cases it is obvious that the changes observed in the lifetime-weighted quantum yield do not correlate with those of the steady-state fluorescence intensity (whereas the former increases between ~5 and 20 % depending on the system, the latter decreases ~10% in EPC, and increases ~45 % for EPG and ~60% for EPC/BPS/Chol. Taken together, this can be interpreted by the existence in water of a second population of peptide that does not fluoresce (probably due to the intra-quenching effect of the Lys residues of the peptide or to aggregate formation), and that in the case of anionic membranes, when the peptide partitions into the membrane there is a structural alteration to a species with a higher quantum yield, and this effect adds-up to the relief of the quenching. As previously described, this is not the case for the zwitterionic membranes.

Studies of the penetration and location of SARS_{FP} in the bilayer.

In order to further explore the possible interaction of SARS_{FP} with the lipid bilayer we studied the accessibility of its Trp residue towards acrylamide, a neutral, water-soluble, highly efficient quencher, which is unable to penetrate into the hydrophobic core of the lipid bilayer. The quenching data is presented in Figure 3A and the resultant Stern-Volmer plots (Table I) reveal a lesser decrement in fluorescence intensity in the presence of liposomes, so that the Trp residue was less accessible to the quencher in the presence of LUVs. In addition, the smallest K_{SV} values were obtained in the presence of negatively-charged phospholipids, EPG, EPC/BPS/CHOL and EPC/BPI/CHOL. Interestingly, the K_{SV} value for Chol-containing zwitterionic membranes was only slightly smaller than in the absence of liposomes and for EPC LUVs the K_{SV} value is between both types of membrane compositions. The plots are linear with

a unitary intercept showing that the Stern-Volmer dynamic quenching formalism describes accurately the data. The K_{SV} value is actually the product of the bimolecular quenching rate constant times the average fluorescence lifetime of the fluorophore in the absence of quenching. In this way, it is important to check if there are significant variations in that parameter in order to compare quencher accessibility from K_{SV} values. At 25°C the average lifetime values (Table II) lay always between 2.17 and 2.59 ns, and, in general, the systems for which a larger K_{SV} was retrieved corresponded to a shorter average lifetime: the order of $K_{SV}/\langle\tau\rangle$ is the same as K_{SV} alone, except for EPG and EPC/BPS/Chol that switch but remain very similar. Therefore, and after accounting for the mean lifetime variations, the accessibility to the aqueous quencher becomes fully correlated with the spectral shifts observed. The transverse location (penetration) of the SARS_{FP} peptide into the lipid bilayer was evaluated by monitoring the relative quenching of the fluorescence of the Trp residues by the lipophilic spin probes 5NS and 16NS when the peptide was incorporated in the fluid phase of vesicles having different phospholipid compositions (Figure 3B). It can be seen that, in general, and for each one of the different membrane compositions studied, the SARS_{FP} peptide was quenched more efficiently by 5NS, quencher for molecules near or at the interface, than by 16NS, quencher for molecules buried deeply in the membrane, allowing to conclude that SARS_{FP} remained close to the lipid/water interface.

Fluorescence lifetime of DPH incorporated into the membrane

The effect of the SARS_{FP} peptide on the chain-packing order, structural and thermotropic properties of phospholipid membranes was further investigated measuring the fluorescence decay of DPH which is known to partition mainly into the hydrophobic core of the membrane. The fluorescence intensity decay of a membrane probe such as DPH is one of the most sensitive

parameters for evaluating perturbations that might take place in the interior of the lipid bilayer. The amplitude and lifetime values of the fluorescence decay components, as well as the values of lifetime-weighted quantum yield and average lifetime of DPH incorporated either in a zwitterionic (DMPC) or an anionic (DMPG) membrane, both below and above the T_m of the phospholipid and in the absence and in the presence of SARS_{FP} are given in Table III. In the absence of the peptide, the fluorescence decay of DPH is always bi-exponential, except for DMPG at 15°C, where a longer component of ~12 ns is the major one, giving rise to a longer lifetime-weighted quantum yield and average lifetime. The presence of the SARS_{FP} peptide makes the decay more complex, originating a short (sub-nanosecond) component with an amplitude of more than ~13 to 36%. The other components, become significantly shorter for DMPG, but this is not the case for DMPC. In addition, in the case of DMPC the quantum yield and the average lifetime are almost independent of temperature. In the case of DMPG, the short component is shorter and contributes more to the decay, and the average lifetime becomes distinctly smaller than in all other cases. Thus, the relative decrease of the average lifetime is stronger for DMPG both above and below T_m .

Membrane rupture, phospholipid mixing and fusion.

In order to explore the effect of SARS_{FP} in the destabilization of membrane vesicles, we studied its effect on the release of encapsulated fluorophores in model membranes made up of various compositions at different peptide to lipid molar ratios (Figures 4A and 4C). LUVs were composed of unsaturated phospholipids instead of saturated ones to avoid the great variability in the basal fluorescence and the rapid release of the probes even in the absence of the peptide as reported previously³⁴. The final maximum values (L_{max}), the rate constants (τ) and the average rate constant ($\langle\tau\rangle$) of the processes obtained from Figure 4A are summarized in Table IV (see

Material and Methods). Considering the average rate constant as the relevant parameter for intersystem comparison, the lower ones, i.e., the faster leakage elicited by SARS_{FP}, took place in LUVs composed of EPC/BPI/Chol, followed by LUVs composed of EPC/BPS/Chol, EPC/Chol and EPC (Table IV). The extent of leakage observed at different P/L ratios and the effect of lipid composition is shown in Figure 4C, where it can be seen that the peptide was able to induce the release of the internal contents of the liposomes in a dose-dependent manner. In the presence of liposomes composed of either EPC/BPI/CHOL or EPC/BPS/CHOL, the SARS_{FP} peptide induced a high percentage of leakage (leakage values of about 95% at a lipid/peptide ratio of 10:1). Slightly lower leakage values were obtained for liposomes composed of EPC/SM/CHOL, EPC or EPC/CHOL (leakage values of between 80 and 90% at a lipid/peptide ratio of 10:1), whereas LUVs composed of EPC/EPE/CHOL, EPG and EPA displayed much lower leakage values (between 55 and 70% at a lipid/peptide ratio of 10:1). This shows that all these membranes are perturbed by the peptide, in agreement with the effect observed on the DPH fluorescence lifetime.

The induction of inner-monolayer phospholipid mixing by the SARS_{FP} peptide, as a measure of its fusogenic activity, was tested with several types of vesicles utilizing the probe dilution assay^{38,39} (Figures 4B and 4D). It became evident that the SARS_{FP} peptide could induce significant inner-monolayer lipid mixing only in the presence of liposomes composed of negatively-charged phospholipids but not with zwitterionic ones. Considering the average rate constant as before, the lower ones, i.e., the faster mixing, took place in LUVs composed of EPC/BPI/Chol, EPC/BPS/Chol and EPG but much lower on the other compositions tested (Table IV). This can be confirmed by observing the extent of mixing in Figure 4D, where only relevant values are observed for compositions having negatively-charged phospholipids (ca. 100% for inner-monolayer phospholipid mixing but discrete for the other compositions). Significantly,

while fusion is similar for all vesicles containing negatively-charged phospholipids, leakage is lower for pure anionic vesicles (compare Figures 4C and 4D), suggesting that the SARS_{FP} peptide induces non-leaky fusion, which is more relevant in virus-membrane fusion processes. In fact, this is true at high lipid to peptide ratios as observed by contents mixing using ANTS/DPX⁴⁰ (not shown for brevity), which are usually closer to the in vivo conditions.

Modulation of membrane dipole potential

Changes on the membrane dipole potential magnitude elicited by SARS_{FP} was monitored by means of the spectral shift of the fluorescence probe di-8-ANEPPS⁴¹⁻⁴³. Furthermore, in order to confirm the specific effect of the SARS_{FP} peptide on liposomes containing negatively-charged phospholipids, we chose LUVs containing only one phospholipid plus cholesterol. The variation of the fluorescence intensity ratio $R_{450/520}$ normalized as a function of the peptide concentration for different membrane compositions is shown in Figure 5. In the presence of the peptide, a great decrease in the $R_{450/520}$ value was measured only in the presence of negatively charged lipid mixtures, i.e., those containing either BPS, EPA or EPG/Chol, confirming again the specific interaction of the peptide with vesicles bearing negatively-charged phospholipids.

Peptide secondary structure from FTIR

The existence of structural changes on the SARS_{FP} peptide induced by membrane binding was studied by Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR). Self-deconvolution, derivation and band-fitting was applied to the original envelope to observe the underlying components of the broad Amide I' band between 1700 and 1600 cm^{-1} ²⁴ at 10°C above the phospholipid T_m , i.e., in the fluid state, and 30°C for the peptide in solution. For the peptide in solution band fitting

yielded different component bands at frequencies about 1672, 1657, 1643, 1630 and 1618 cm^{-1} (not shown for brevity) that can be respectively assigned to β -turns, α -helix or 3_{10} -helix, unordered structures, β -sheet and extended β -strands with strong intermolecular interactions, respectively²⁴. The frequencies of the Amide I' component bands for SARS_{FP} in the presence of DMPC, DMPG and DMPA were nearly identical to those found for the peptide in solution, but their intensity varied slightly (not shown for brevity). The most significant difference between the peptide Amide I' band in the different systems studied is the increase in the relative intensity of the bands assigned to extended β -strands with strong intermolecular interactions in the presence of the phospholipids (from 31% to about 35-36%), as well as an increase in half bandwidth at half height of about 3-8 cm^{-1} (not shown). A significant part of the structure is retained in all cases, in agreement with the fluorescence intensity decay parameters of the peptide which show absence of strong alterations around the Trp residue (see below).

Fluorescence anisotropy of the Trp residue of SARS_{FP}

Another relevant fluorescence parameter is the steady-state fluorescence anisotropy of the Trp residue of SARS_{FP}, which gives insight on the motional restrictions affecting the Trp region of the peptide when inserted into the membrane. However, the anisotropy is also very sensitive to the size of the entity containing the fluorophore, especially in solution, where the viscosity is low enough to make the rotational diffusion to take place in the time scale of the fluorescence emission. Thus, it helps to determine the aggregation state of the peptide in water, because the size of the particle is directly proportional to the number of molecules in the aggregate. One simple way of obtaining this information is from the rotational correlation time ϕ of the peptide in buffer solution, which can be retrieved from the fluorescence anisotropy decay. This parameter can be predicted from simple calculations assuming a spherical rotor (Stokes-Einstein

equation): $\phi = \eta V / RT$, where η is the solvent's viscosity, V is the hydrodynamic volume of the peptide, R is the gas constant and T is the absolute temperature. The volume of the peptide can be calculated from the amino acid sequence⁴⁴, giving a value of 2812 \AA^3 . The input value of V can be doubled, tripled, etc. in order to retrieve the expected value of ϕ for a dimer, a trimer, etc. The value of ϕ can be also obtained experimentally from the fluorescence anisotropy decay (not shown; see Materials and Methods). In Table V the experimental value of ϕ together with the values predicted for a monomer and a dimer (Stokes-Einstein equation) are given for 15°C and 25°C . It can be easily observed that the experimental value is much closer to the monomer value, even slightly shorter. To further confirm that the value of ϕ obtained from the fit to the experimental anisotropy decay is correct (because this is a complex mathematical procedure) the steady-state anisotropy was also calculated from the Perrin equation, i.e., $\langle r \rangle = r_0 / (1 + \langle \tau \rangle / \phi)$ where r_0 is the fundamental anisotropy (these values are also shown in Table V). The original equation is valid for a fluorophore with a mono-exponential decay, but we have previously verified that this simplified form with the mean fluorescence lifetime is a very good approximation for Trp containing peptides in buffer solution³². The agreement between the experimental steady-state anisotropy and the anisotropy calculated from the Perrin equation with the experimental ϕ is very good, and it can be safely concluded that the fluorescent peptide species is largely monomeric in water in the concentration and temperature range used for fluorescence experiments. Upon interaction with the membrane, the anisotropy significantly changes. In the case of the zwitterionic mixture, there is a slight increase of the anisotropy, whereas for the anionic membranes there is a larger increase. It is usual to observe an increase in the anisotropy of Trp for peptides interacting with the membrane, because the movements of both the indol ring and the peptide backbone are slower and more restricted. The effect correlates with previous parameters described in this work that account for the strength of the interaction of the peptide with those membranes.

DISCUSSION

Membrane fusion can be described as a succession of different steps, namely apposition of membranes, hemifusion of the outer leaflets to form a stalk, fusion pore formation through merging of both bilayers at the stalk point and finally, fusion pore enlargement with full contents mixing^{45,46}. The membrane fusion protein of SARS CoV is the envelope Spike glycoprotein and it is thought that several trimers of the S protein are capable of juxtaposing, destabilizing and merging the viral and cellular membranes so that a fusion-pore is formed as it has been already described for other Class I membrane fusion proteins. Furthermore, there are several regions within Class I and Class II membrane fusion proteins which are involved in the fusion process, and are decisive for membrane fusion to take place since destabilization of the lipid bilayer and membrane fusion appears then to be the result of the binding and interaction of these segments with the biological membranes. We have selected a specific segment from the SARS CoV sequence which is proposed to be the putative fusion peptide of the SARS spike glycoprotein³⁶, to carry out a biophysical study, aiming to elucidate how the capacity of this region to interact and disrupt membranes depends on lipid composition, and which structural and dynamic features are relevant for that disruption.

The SARS-CoV SARS_{FP} peptide studied in this work partitions with high affinity to model membranes having different phospholipid compositions. The degree of partitioning of the SARS-CoV SARS_{FP} peptide is much higher for vesicles containing negatively-charged phospholipids as it has been also found for other peptides pertaining to other membrane fusion proteins, which showed similar binding affinities as reported previously^{24,25,47}. This specificity was further demonstrated by the ability of the SARS_{FP} peptide to induce vesicle aggregation, since it was greater on liposomes containing negatively charged phospholipids than on

zwitterionic ones. The binding force was mainly from an electrostatic origin, presumably owing to the positive net charge (+2) of the peptide. However, hydrophobic interactions also play an important role, because the parameters described above do not completely correlate to the total surface charge of the different membranes used. This is the case of the mixtures containing 33% of BPS or BPI. Not only the head-group is different, but a contribution arising from the fact that *sn*-1/*sn*-2 acyl chains are mainly saturated/monounsaturated in BPS and saturated/polyunsaturated in PI cannot be ruled out.

As pointed out previously, for EPC and EPC/ESM containing liposomes, a slight decrease in fluorescence intensity was observed (Figure 2A). This nontrivial effect can be due either to a structural alteration where the Lys residues would become more accessible to the Trp, thereby quenching its emission (see ⁴⁸), or to the formation of aggregates with a concomitant quenching of Trp emission. This was further demonstrated by hydrophilic (acrylamide) and lipophilic (NS) probe quenching. In the case of acrylamide quenching data, the smallest K_{SV} values were observed in the presence of negatively-charged phospholipids, suggesting that the SARS_{FP} Trp residue is less accessible for quenching by acrylamide and therefore interacting more deeply with the membrane. However, it was also shown above that the SARS_{FP} peptide was quenched more efficiently by 5NS than 16NS suggesting that in all cases the peptide was near the membrane lipid/water interface in a shallow position. A greater quenching efficiency was observed for model membranes containing only negatively-charged phospholipids, suggesting that in the case of EPC/BPS/Chol the Trp residue is somehow less accessible to both lipophilic probes than in EPG, probably because it is in an aggregate form relevant for its biological action (note that the Trp in the case of EPC/BPS/Chol is also less accessible to the aqueous quencher acrylamide). This suggests that the organization of the peptide in the membrane is not the same in EPG and EPC/BPS/Chol, because the quenching efficiency is

higher with both 5NS and 16NS for the EPG case. This is in agreement with a different membrane/water steady-state intensity ratio and lifetime-weighted quantum yield observed for the peptide in these two anionic systems. This was confirmed by the longer fluorescence decay lifetimes of the Trp residue of the peptide in the presence of either one anionic or one zwitterionic lipid (EPG or EPC) as compared to the anionic or zwitterionic mixture, respectively (EPC/BPS/Chol and EPC/Chol). This reduction in lifetime could be consequence of a self-quenching process effective in regions that are peptide-enriched.

The SARS-CoV SARS_{FP} peptide was also capable of altering membrane stability causing the release of fluorescent probes. However this effect was dependent on lipid composition and on the lipid/peptide molar ratio, being the highest effect observed for liposomes containing negatively-charged phospholipids. Lower but significant leakage values were also observed for liposomes composed of zwitterionic phospholipids, so that the effect observed on these vesicles should be due primarily to hydrophobic interactions within the bilayer but not to the specific charge of the phospholipid head-groups. In fact, all the data shows that although the peptide is able to interact and perturb the zwitterionic membranes, the strength of the interaction is insufficient to induce extensive fusion and i.e., the aggregation activity of the peptide is quite limited with those membranes. For example, the fluorescence decay of DPH was affected by the peptide both in DMPC and in DMPG membranes, although the perturbation was stronger with the latter lipid. The short component and the shortening of the other components in DPH fluorescence decay induced by the peptide (Table III) may be interpreted as a deeper penetration of water into the acyl chain region, because it is well known that the quantum yield of DPH is quite low in water. Thus, in the case of DMPG all the bilayer is strongly and deeply perturbed. On the other hand, in the case of DMPC, there is a similar membrane perturbation with water penetration revealed by the short component, but the perturbation is not as strong as in the case

of DMPG because the average lifetimes do not decrease so drastically. Thus, the water penetration and membrane perturbation sensed by DPH relates with the membrane activity essays of leakage and fusion.

The binding to the surface and the modulation of the phospholipid biophysical properties which take place when the peptide is bound to the membrane, i.e., partitioning into the membrane surface and perturbation of the bilayer architecture, could be related to the conformational changes which might occur during the activity of the SARS-CoV Spike protein. In the case of zwitterionic membranes, it is probable that the adequate conformational changes are not taking place. The induction of fusion by the SARS_{FP} peptide were also studied and similar results were obtained, since specific and large membrane fusion values were found only in the presence of liposomes composed of negatively-charged phospholipids. These data was confirmed by the change in the membrane dipole potential elicited by SARS_{FP} in the presence of vesicles bearing negatively-charged phospholipids. The differences we have found on the effect produced by the SARS_{FP} peptide on leakage and fusion, i.e., high values in the presence of negatively-charged phospholipids, but lower for the other types of phospholipids studied here, might indicate that negatively-charged phospholipids could play an important role and stimulate the fusion process, i.e., approximation and binding of the protein to the membrane occurs for mixtures containing a small fraction of anionic lipids where the zwitterionic lipids help the proper organization of the peptide, whereas the ensuing destabilization with the formation of a fusogenic structure requires more anionic phospholipids. Thus, this destabilization can be further increased by the higher concentration of anionic lipids which exists in the inner cell membrane leaflet. The fusion assay shows that leakage probably corresponds to a perturbation of the membrane and is mainly unspecific, and the fusion activity is much more specific. Furthermore, it is not the fact that a ternary mixture is present that induces those activities, but the presence of

a negatively charged lipid, because in zwitterionic ones, even with two or three components the peptide has a much lower and generally uncorrelated fusion activity. However, there are several data that indicate a stronger interaction in the mixtures containing the anionic and zwitterionic lipids as compared with anionic lipid alone, which may be related to the formation of nanoclusters of peptide and anionic lipid where the fusogenic structure formation takes place, indicating that the virus is adapted to the complex lipid composition of the target cell membrane.

Wimley and coworkers have made a remarkable study of this system, both in this peptide⁴⁹ and also in other peptides derived from the S glycoprotein^{50,51}. Regarding the data obtained for this peptide, there is a fair agreement in most of the conclusions, namely evidence for β -sheet aggregation, which is reported in their work from CD data and in the IR study we present here. However, distinct evidence was noted in some points, i.e., we have found that the K_p values for membrane systems in the absence of negatively-charged phospholipids are extremely low and in addition a peculiar pattern was obtained for the fluorescence intensity, since a decrease in Trp fluorescence intensity was observed, pointing out to a structural alteration and/or aggregation of the peptide. In the present work we also show that the SARS-CoV SARS_{FP} peptide is capable of affecting the palisade structure of the membrane, through studies of the fluorescence intensity decay of DPH. Although the peptide is not deeply buried in the membrane, as commented above, it is able to affect the lipid milieu from its surface where it locates down to the hydrophobic core where DPH resides, and in this last case, leaving the probe exposed to an aqueous-like environment. The peptide perturbs more strongly the bilayer in the case of negatively-charged phospholipids as shown by the fluorescence intensity decay of DPH, both in the gel and in the fluid phospholipid phase. The infrared spectra of the Amide I' region of the fully hydrated peptide did not change with temperature, indicating a high stability of its conformation, where extended β -strands with strong intermolecular interactions predominated. Moreover, we did not

find significant changes on the proportion of the different secondary elements when the peptide was incorporated into membranes of different compositions. This is in agreement with i) the fluorescence lifetime of the peptide, for which only minor changes were observed and ii) the CD experiments of Sainz et al. ⁴⁹ that had to reduce significantly the concentration of peptide and measure the spectra in limiting conditions in order to observe alterations (namely induction of β -type structures) upon membrane incorporation, because for typical CD concentrations the peptide in buffer already shown propensity for β -aggregate formation. In addition, it strongly points to a biological active form of the peptide to be the membrane-bound aggregate, because for very diluted peptide, the membrane induces a structure that is similar to the one in water with higher concentration ⁴⁹. In addition, the fluorescence lifetime parameters underwent a less noticeable change for the EPC/BPS/Chol lipid system, which is the one with stronger interaction with the peptide. This data would suggest that apart from a negatively-charged phospholipid, the presence of a more sizeable head-group would be important in the peptide-membrane interaction perhaps allowing a hydrophobic interaction in a shallow position by protecting the more hydrophobic residues of SARS_{FP} from water. It is interesting to note that the fluorescent form of the peptide in buffer, is largely monomeric, as concluded from the fluorescence anisotropy of its Trp residue, whereas in the presence of a membrane the peptide should be arranged in a somehow regular aggregate. In this case, different Trp residues should be close to each other, protected from interaction with the Lys residues, hence with a stronger steady-state fluorescence intensity than in water, leading possibly to the formation of a highly fusogenic structure. From the small changes in fluorescence lifetime parameters, it is very reasonable to suppose that although the structure of the peptide is not very different in water and in the membrane bound form, the way itself organizes should be completely different (note that in the membranes where the fluorescence intensity of the peptide decreases in relation to water, the fusogenic activity is also quite low). It is known that, in the case of Class I membrane fusion proteins, several fusion

peptide fragments pertaining to different trimers can promote the formation of local nipples in the cell membrane leading to the formation of local bends which could induce zones of non-lamellar phases on the outer leaflet⁵². It would be possible that to compensate for the imbalance produced by a different phospholipid assembly, phospholipid flip-flop from the inner leaflet to the outer leaflet—could be endorsed⁵³. The present data would suggest that disassembly of the core could possibly happen only after exposure to negatively charged membranes, either by flip-flop or when in contact with the inner leaflet, i.e., by making small holes in the outer leaflet, as shown by the short component induced in the fluorescence decay of DPH, which shows up both in negative as well as in neutral lipid membranes. It is quite interesting to notice that the model system used here that most resembles mammalian plasma membrane outer leaflet (EPC/SM/Chol) is the one inducing a smaller spectral shift, a more noticeable decrease of fluorescence intensity of the peptide, less vesicle aggregation, and no detectable fusion. In this way the transverse asymmetry of the target cell membrane, which is challenged by the perturbation induced by the peptide in the outer leaflet, becomes of importance for the process. In this way, the region where the SARS-CoV SARS_{FP} peptide is located could interact with the negatively-charged leaflet favoring the fusion process, leading to the fusogenic pore formation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant BFU2005-00186-BMC (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) to J.V. and PTDC/QUI/68151/2006 (Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal). J.G. is recipient of pre-doctoral fellowship from the Autonomous Government of the Valencian Community, Spain. R.F.M. de A. was a recipient of a post-doctoral fellowship from F.C.T., Portugal (SFRH/BPD/32210/2006). We are especially grateful to Ana I. Gómez Sanchez and Alexander Fedorov for their excellent technical assistance.



REFERENCES

- (1) Marra, M. A.; Jones, S. J.; Astell, C. R.; Holt, R. A.; Brooks-Wilson, A.; Butterfield, Y. S.; Khattra, J.; Asano, J. K.; Barber, S. A.; Chan, S. Y.; Cloutier, A.; Coughlin, S. M.; Freeman, D.; Girn, N.; Griffith, O. L.; Leach, S. R.; Mayo, M.; McDonald, H.; Montgomery, S. B.; Pandoh, P. K.; Petrescu, A. S.; Robertson, A. G.; Schein, J. E.; Siddiqui, A.; Smailus, D. E.; Stott, J. M.; Yang, G. S.; Plummer, F.; Andonov, A.; Artsob, H.; Bastien, N.; Bernard, K.; Booth, T. F.; Bowness, D.; Czub, M.; Drebot, M.; Fernando, L.; Flick, R.; Garbutt, M.; Gray, M.; Grolla, A.; Jones, S.; Feldmann, H.; Meyers, A.; Kabani, A.; Li, Y.; Normand, S.; Stroher, U.; Tipples, G. A.; Tyler, S.; Vogrig, R.; Ward, D.; Watson, B.; Brunham, R. C.; Krajdén, M.; Petric, M.; Skowronski, D. M.; Upton, C.; Roper, R. L. *Science* **2003**, *300*, 1399.
- (2) Rota, P. A.; Oberste, M. S.; Monroe, S. S.; Nix, W. A.; Campagnoli, R.; Icenogle, J. P.; Penaranda, S.; Bankamp, B.; Maher, K.; Chen, M. H.; Tong, S.; Tamin, A.; Lowe, L.; Frace, M.; DeRisi, J. L.; Chen, Q.; Wang, D.; Erdman, D. D.; Peret, T. C.; Burns, C.; Ksiazek, T. G.; Rollin, P. E.; Sanchez, A.; Liffick, S.; Holloway, B.; Limor, J.; McCaustland, K.; Olsen-Rasmussen, M.; Fouchier, R.; Gunther, S.; Osterhaus, A. D.; Drosten, C.; Pallansch, M. A.; Anderson, L. J.; Bellini, W. J. *Science* **2003**, *300*, 1394.
- (3) Kan, B.; Wang, M.; Jing, H.; Xu, H.; Jiang, X.; Yan, M.; Liang, W.; Zheng, H.; Wan, K.; Liu, Q.; Cui, B.; Xu, Y.; Zhang, E.; Wang, H.; Ye, J.; Li, G.; Li, M.; Cui, Z.; Qi, X.; Chen, K.; Du, L.; Gao, K.; Zhao, Y. T.; Zou, X. Z.; Feng, Y. J.; Gao, Y. F.; Hai, R.; Yu, D.; Guan, Y.; Xu, J. *J Virol* **2005**, *79*, 11892.
- (4) Li, W.; Moore, M. J.; Vasilieva, N.; Sui, J.; Wong, S. K.; Berne, M. A.; Somasundaran, M.; Sullivan, J. L.; Luzuriaga, K.; Greenough, T. C.; Choe, H.; Farzan, M. *Nature* **2003**, *426*, 450.
- (5) Jeffers, S. A.; Tusell, S. M.; Gillim-Ross, L.; Hemmila, E. M.; Achenbach, J. E.; Babcock, G. J.; Thomas, W. D., Jr.; Thackray, L. B.; Young, M. D.; Mason, R. J.; Ambrosino, D. M.; Wentworth, D. E.; Demartini, J. C.; Holmes, K. V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 15748.
- (6) Masters, P. S. *Adv Virus Res* **2006**, *66*, 193.
- (7) Xiao, X.; Chakraborti, S.; Dimitrov, A. S.; Gramatikoff, K.; Dimitrov, D. S. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, *312*, 1159.
- (8) Howard, M. W.; Triplet, B.; Jobling, M. G.; Holmes, R. K.; Holmes, K. V.; Hodges, R. S. *Adv Exp Med Biol* **2006**, *581*, 319.
- (9) Xu, Y.; Zhu, J.; Liu, Y.; Lou, Z.; Yuan, F.; Liu, Y.; Cole, D. K.; Ni, L.; Su, N.; Qin, L.; Li, X.; Bai, Z.; Bell, J. I.; Pang, H.; Tien, P.; Gao, G. F.; Rao, Z. *Biochemistry* **2004**, *43*, 14064.
- (10) Ingallinella, P.; Bianchi, E.; Finotto, M.; Cantoni, G.; Eckert, D. M.; Supekar, V. M.; Bruckmann, C.; Carfi, A.; Pessi, A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 8709.
- (11) Gallaher, W. R. *Cell* **1996**, *85*, 477.
- (12) Chambers, P.; Pringle, C. R.; Easton, A. J. *J Gen Virol* **1990**, *71* (Pt 12), 3075.
- (13) Bosch, B. J.; van der Zee, R.; de Haan, C. A.; Rottier, P. J. *J Virol* **2003**, *77*, 8801.
- (14) Liu, S.; Xiao, G.; Chen, Y.; He, Y.; Niu, J.; Escalante, C. R.; Xiong, H.; Farmer, J.; Debnath, A. K.; Tien, P.; Jiang, S. *Lancet* **2004**, *363*, 938.
- (15) Triplet, B.; Howard, M. W.; Jobling, M.; Holmes, R. K.; Holmes, K. V.; Hodges, R. S. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 20836.
- (16) Zhu, J.; Xiao, G.; Xu, Y.; Yuan, F.; Zheng, C.; Liu, Y.; Yan, H.; Cole, D. K.; Bell, J. I.; Rao, Z.; Tien, P.; Gao, G. F. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *319*, 283.

- (17) Supekar, V. M.; Bruckmann, C.; Ingallinella, P.; Bianchi, E.; Pessi, A.; Carfi, A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 17958.
- (18) Xu, Y.; Lou, Z.; Liu, Y.; Pang, H.; Tien, P.; Gao, G. F.; Rao, Z. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 49414.
- (19) Epand, R. M. *Biochim Biophys Acta* **2003**, *1614*, 116.
- (20) Colotto, A.; Epand, R. M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 7644.
- (21) Siegel, D. P.; Epand, R. M. *Biophys J* **1997**, *73*, 3089.
- (22) Aranda, F. J.; Teruel, J. A.; Ortiz, A. *Biochim Biophys Acta* **2003**, *1618*, 51.
- (23) Contreras, L. M.; Aranda, F. J.; Gavilanes, F.; Gonzalez-Ros, J. M.; Villalain, J. *Biochemistry* **2001**, *40*, 3196.
- (24) Bernabeu, A.; Guillen, J.; Perez-Berna, A. J.; Moreno, M. R.; Villalain, J. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1768*, 1659.
- (25) Moreno, M. R.; Guillen, J.; Perez-Berna, A. J.; Amoros, D.; Gomez, A. I.; Bernabeu, A.; Villalain, J. *Biochemistry* **2007**, *46*, 10572.
- (26) Perez-Berna, A. J.; Guillen, J.; Moreno, M. R.; Bernabeu, A.; Pabst, G.; Laggner, P.; Villalain, J. *J Biol Chem* **2008**.
- (27) Böttcher, C. S. F.; Van Gent, C. M.; Fries, C. *Anal Chim Acta* **1961**, *1061*, 203.
- (28) Edelhoch, H. *Biochemistry* **1967**, *6*, 1948.
- (29) de Almeida, R. F.; Borst, J.; Fedorov, A.; Prieto, M.; Visser, A. J. *Biophys J* **2007**.
- (30) de Almeida, R. F.; Loura, L. M.; Fedorov, A.; Prieto, M. *J Mol Biol* **2005**, *346*, 1109.
- (31) De Almeida, R. F.; Loura, L. M.; Prieto, M.; Watts, A.; Fedorov, A.; Barrantes, F. *J. Mol Membr Biol* **2006**, *23*, 305.
- (32) Contreras, L. M.; de Almeida, R. F.; Villalain, J.; Fedorov, A.; Prieto, M. *Biophys J* **2001**, *80*, 2273.
- (33) Giudici, M.; Pascual, R.; de la Canal, L.; Pfuller, K.; Pfuller, U.; Villalain, J. *Biophys J* **2003**, *85*, 971.
- (34) Pascual, R.; Contreras, M.; Fedorov, A.; Prieto, M.; Villalain, J. *Biochemistry* **2005**, *44*, 14275.
- (35) Peisajovich, S. G.; Shai, Y. *Biochim Biophys Acta* **2003**, *1614*, 122.
- (36) Guillen, J.; Perez-Berna, A. J.; Moreno, M. R.; Villalain, J. *J Virol* **2005**, *79*, 1743.
- (37) Blumenthal, R.; Clague, M. J.; Durell, S. R.; Epand, R. M. *Chem Rev* **2003**, *103*, 53.
- (38) Struck, D. K.; Hoekstra, D.; Pagano, R. E. *Biochemistry* **1981**, *20*, 4093.
- (39) Meers, P.; Ali, S.; Erukulla, R.; Janoff, A. S. *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1467*, 227.
- (40) Perez-Berna, A. J.; Moreno, M. R.; Guillen, J.; Bernabeu, A.; Villalain, J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 3755.
- (41) Cladera, J.; Martin, I.; O'Shea, P. *Embo J* **2001**, *20*, 19.
- (42) O'Shea, P. *Biochem Soc Trans* **2003**, *31*, 990.
- (43) Cladera, J.; O'Shea, P. *Biophys J* **1998**, *74*, 2434.
- (44) Kuntz, I. D., Jr.; Kauzmann, W. *Adv Protein Chem* **1974**, *28*, 239.
- (45) Zimmerberg, J.; Chernomordik, L. V. *Adv Drug Deliv Rev* **1999**, *38*, 197.
- (46) Chernomordik, L. V.; Kozlov, M. M. *Cell* **2005**, *123*, 375.
- (47) Guillen, J.; Moreno, M. R.; Perez-Berna, A. J.; Bernabeu, A.; Villalain, J. *J Phys Chem B* **2007**.
- (48) de Almeida, R. F.; Loura, L. M.; Prieto, M.; Watts, A.; Fedorov, A.; Barrantes, F. *J. Biophys J* **2004**, *86*, 2261.

- (49) Sainz, B., Jr.; Rausch, J. M.; Gallaher, W. R.; Garry, R. F.; Wimley, W. C. *J Virol* **2005**, *79*, 7195.
- (50) Sainz, B., Jr.; Mossel, E. C.; Gallaher, W. R.; Wimley, W. C.; Peters, C. J.; Wilson, R. B.; Garry, R. F. *Virus Res* **2006**, *120*, 146.
- (51) Sainz, B., Jr.; Rausch, J. M.; Gallaher, W. R.; Garry, R. F.; Wimley, W. C. *Biochemistry* **2005**, *44*, 947.
- (52) Dimitrov, A. S.; Xiao, X.; Dimitrov, D. S.; Blumenthal, R. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 30335.
- (53) Janmey, P. A.; Kinnunen, P. K. *Trends Cell Biol* **2006**, *16*, 538.



TABLE I

Partition coefficient (K_p), spectral shift ($\Delta\lambda$) and acrylamide Stern-Volmer (K_{sv}) quenching constant for the SARS_{FP} peptide in buffer and in the presence of LUVs of different compositions. $\Delta\lambda$ corresponds to a peptide/lipid ratio of 1:100.

LUV composition	K_p	$\Delta\lambda$ (nm)	K_{sv} (M^{-1})
EPC	nd	3	7.90
EPC/Chol 5:1	nd	3	10.7
EPC/EPE/ Chol 5:3:1	nd	2	10.0
EPC/ESM/ Chol 5:3:1	nd	0	11.6
EPC/BPI/ Chol 5:3:1	$(0.80 \pm 0.25) \cdot 10^6$	7	4.40
EPC/BPS/ Chol 5:3:1	$(1.60 \pm 0.43) \cdot 10^6$	7	3.60
EPG	$(1.15 \pm 0.46) \cdot 10^6$	8	3.80
SARS _{FP} in buffer	-	-	14.3

TABLE II

Fluorescence lifetime components τ_i , normalized amplitudes α_i , and fluorescence mean lifetime (amplitude weighted, $\bar{\tau}$, and intensity weighted, $\langle\tau\rangle$) of the Trp residue of the SARS_{FP} peptide in buffer and in the presence of some phospholipid model membranes at 25°C. The reduced chi square values of the fits to the experimental fluorescence decays are also given.

System	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	α_1	α_2	α_3	$\bar{\tau}$ (ns)	$\langle\tau\rangle$ (ns)	χ^2
Buffer 15°C	0.395	1.43	3.15	0.368	0.394	0.238	1.46	2.21	1.10
Buffer 25°C	0.301	1.32	3.31	0.310	0.498	0.192	1.39	2.17	1.23
Buffer 50°C	0.179	0.824	2.16	0.310	0.563	0.126	0.79	1.24	1.12
EPC	0.444	1.56	4.20	0.350	0.485	0.165	1.60	2.59	1.16
EPG	0.391	1.47	3.70	0.320	0.449	0.231	1.64	2.55	1.28
EPC/Chol 5:1	0.332	1.35	4.20	0.475	0.388	0.137	1.26	2.52	1.15
EPC/BPS/Chol 5:3:1	0.360	1.42	3.62	0.335	0.480	0.185	1.47	2.34	1.17

TABLE III

Fluorescence lifetime components τ_i , normalized amplitudes α_i , and fluorescence mean lifetimes (amplitude weighted, $\bar{\tau}$, and intensity weighted, $\langle\tau\rangle$) of DPH in phospholipid model membranes in the absence and in the presence of the SARS_{FP} peptide below and above the phospholipid T_m .

T (°C)	System	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	α_1	α_2	α_3	$\bar{\tau}$ (ns)	$\langle\tau\rangle$ (ns)	χ^2
15°C	DMPG + SARS _{FP}	0.455	2.05	8.41	0.318	0.458	0.224	2.97	6.01	1.15
	DMPG	0.876	6.17	12.17	0.136	0.085	0.778	10.12	11.72	1.24
	DMPC + SARS _{FP}	0.779	3.13	9.17	0.205	0.520	0.275	4.30	6.57	1.09
	DMPC	---	6.11	9.85	0	0.245	0.755	8.93	9.22	1.07
35°C	DMPG + SARS _{FP}	0.290	1.67	6.40	0.360	0.511	0.129	1.78	3.78	1.12
	DMPG	---	1.50	9.19	0	0.182	0.818	7.79	8.92	1.06
	DMPC + SARS _{FP}	0.502	2.591	7.487	0.128	0.472	0.400	4.28	5.98	1.12
	DMPC	---	2.830	7.947	0	0.137	0.823	7.24	7.67	1.09

TABLE IV

Fitted parameters for leakage and fusion induced by SARS_{FP} in LUVs of different lipid compositions (see Figure 4 for experimental data and fitting curves). The lipid to peptide ration was 15:1 for leakage and 10:1 for fusion.

LUV composition	Leakage (%L_{max})	τ_1 (s)	τ_2 (s)	$\langle\tau\rangle$ (s)	Fusion (%F_{max})	τ_1 (s)	τ_2 (s)	$\langle\tau\rangle$ (s)
EPC	77	38	406	196	10	1523	1548	1531
EPG	50	65	1000	425	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EPA	41	98	682	369	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EPC/ Chol 5:1	75	210	13	168	15	2489	223	1482
EPC/EPE/ Chol 5:3:1	66	546	239	395	18	737	31	502
EPC/SM/ Chol 5:3:1	85	76	346	203	1	-	-	-
EPC/BPI/ Chol 5:3:1	92	43	138	91	63	57	680	125
EPC/BPS/ Chol 5:3:1	91	120	212	165	63	60	625	186

TABLE V

Rotational correlation time ϕ of the peptide in buffer solution at different temperatures and steady-state anisotropy $\langle r \rangle$ of the peptide in the absence and in the presence of different lipid membranes at 25°C

System	$\langle r \rangle_{\text{experimental}}$	$\langle r \rangle_{\text{integration}}^a$	$\phi_{\text{experimental}} \text{ (ns)}^b$	$\phi_{\text{monomer}} \text{ (ns)}^c$	$\phi_{\text{dimer}} \text{ (ns)}^c$
Buffer 15°C	0.059	0.062	0.71	0.81	1.61
Buffer 25°C	0.053	0.052	0.57	0.61	1.22
EPC/Chol 5:1	0.066	---	---	---	---
EPG	0.139	---	---	---	---
EPC/BPS/Chol 5:3:1	0.103	---	---	---	---

^a From Perrin equation using the experimental ϕ .

^b From the fit of a monoexponential decay law to the experimental fluorescence anisotropy decay curve (not shown).

^c From the Stokes-Einstein equation.

FIGURE CAPTIONS

FIGURE 1.

(A) Scheme of the structure of SARS-CoV spike glycoprotein S (amino acid residues 1 to 1255 for the full-length), as well as the S1 and S2 domains, according to literature consensus. The relevant functional regions are highlighted: the N-terminal signal peptide (SP), the transmembrane domain (TM) and the predicted heptad repeat regions pertaining to the S2 domain, HR1 and HR2. The putative fusion domain is located at the N terminus of the S2 subunit. The sequence of the peptide used in this work is also shown. It should be noted that the size of each domain is not drawn to an exact scale. (B) Hydrophobic moment, hydrophobicity, interfaciality distribution, and relative position of the SARS_{FP} peptide used in this study along the SARS-CoV spike S2 domain, assuming it forms an α -helical wheel (see ³⁶ for details). Only positive bilayer-to-water transfer free-energy values are depicted (shaded areas).

FIGURE 2.

A) Change on the tryptophan fluorescence intensity of the SARS_{FP} peptide in the presence of increasing lipid concentration with the fit to the data, and (B) variation of optical density (monitoring of LUV aggregation) for different lipid compositions at different peptide to lipid ratios (lines are only to guide the eye). The lipid compositions used were EPG (◆), EPC (■), EPC/BPI/CHOL (5:3:1) (○), EPC/BPS/CHOL (5:3:1) (□), EPC/EPE/CHOL (5:3:1) (Δ), EPC/ESM/CHOL (5:3:1) (●) and EPC/CHOL (5:1) (◇). In (A), the tryptophan fluorescence intensity of the SARS_{FP} peptide was measured also in LUVs composed of EPC/BPS/CHOL (5:3:1) in buffer containing 100 mM NaCl (◻) and 150 mM NaCl (⊠).

FIGURE 3.

(A) Stern-Volmer plots of the quenching of the Trp fluorescence emission of SARS_{FP} by acrylamide in aqueous buffer (∇), and in the presence of liposomes composed of EPG (\blacklozenge), EPC (\blacksquare), EPC/BPI/CHOL (5:3:1) (\circ), EPC/BPS/CHOL (5:3:1) (\square), EPC/EPE/CHOL (5:3:1) (Δ), EPC/SM/CHOL (5:3:1) (\bullet) and EPC/CHOL (\diamond) and fitting of the Stern-Volmer equation. (B) Quenching of the Trp fluorescence emission of SARS_{FP} by 5NS (filled symbols) and 16NS (empty symbols) in LUVs composed of EPC (\blacksquare , \square), EPC/BPS/CHOL at a molar ratio of 5:3:1 (\bullet , \circ) and EPG (\blacktriangle , Δ) vs. the effective quencher concentration. The lipid to peptide ratio was 50:1.

FIGURE 4.

Effect of the SARS_{FP} peptide on membrane rupture, i.e., leakage (A and C) and membrane phospholipid mixing of the inner monolayer, i.e., fusion (B and D) of fluorescent probes encapsulated in LUVs of different lipid compositions at different lipid-to-peptide molar ratios. The kinetic and extent assays are shown in (A and B) and in (C and D) respectively. The lipid compositions were EPC (\blacksquare), EPG (\blacklozenge), EPA (\blacktriangle), EPC/BPI/CHOL (5:3:1) (\circ), EPC/BPS/CHOL (5:3:1) (\square), EPC/EPE/CHOL (5:3:1) (Δ), EPC/SM/CHOL (5:3:1) (\bullet) and EPC/CHOL (5:1) (\diamond). See text for details and Table IV for the fitting parameters.

FIGURE 5.

Effect of the SARS_{FP} peptide on the membrane dipole potential monitored through the fluorescence ratio (R) of di-8-ANEPPS labeled LUVs containing different lipid compositions at different lipid-to-peptide molar ratios. The lipid compositions were

EPC/CHOL (5:1) (◇), EPG/CHOL (5:1) (◆), EPA/CHOL (5:1) (▲), BPS/CHOL (5:1) (□).



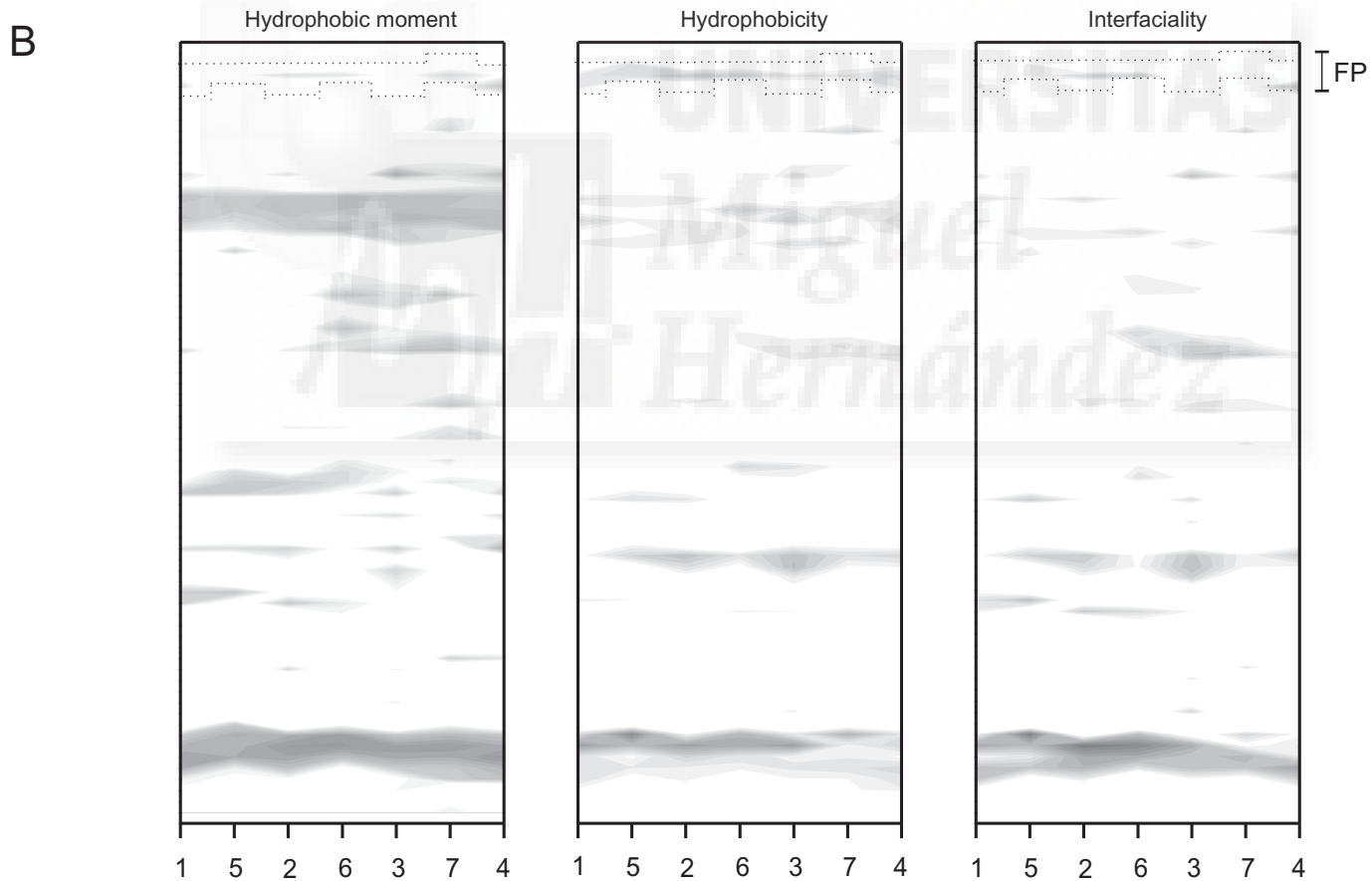
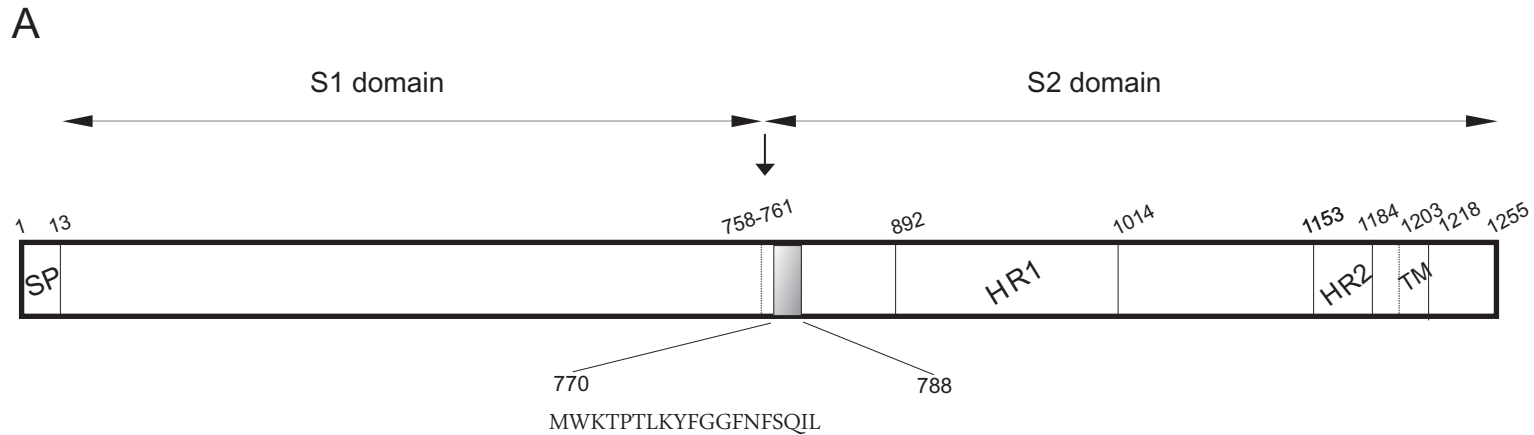


FIGURE 2

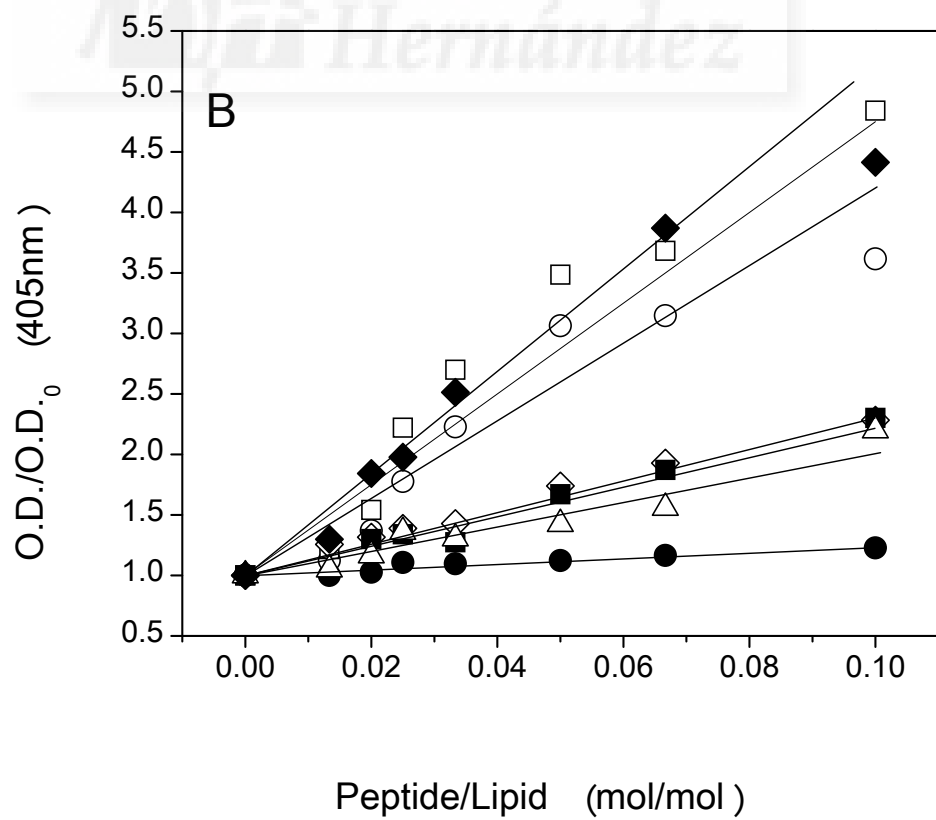
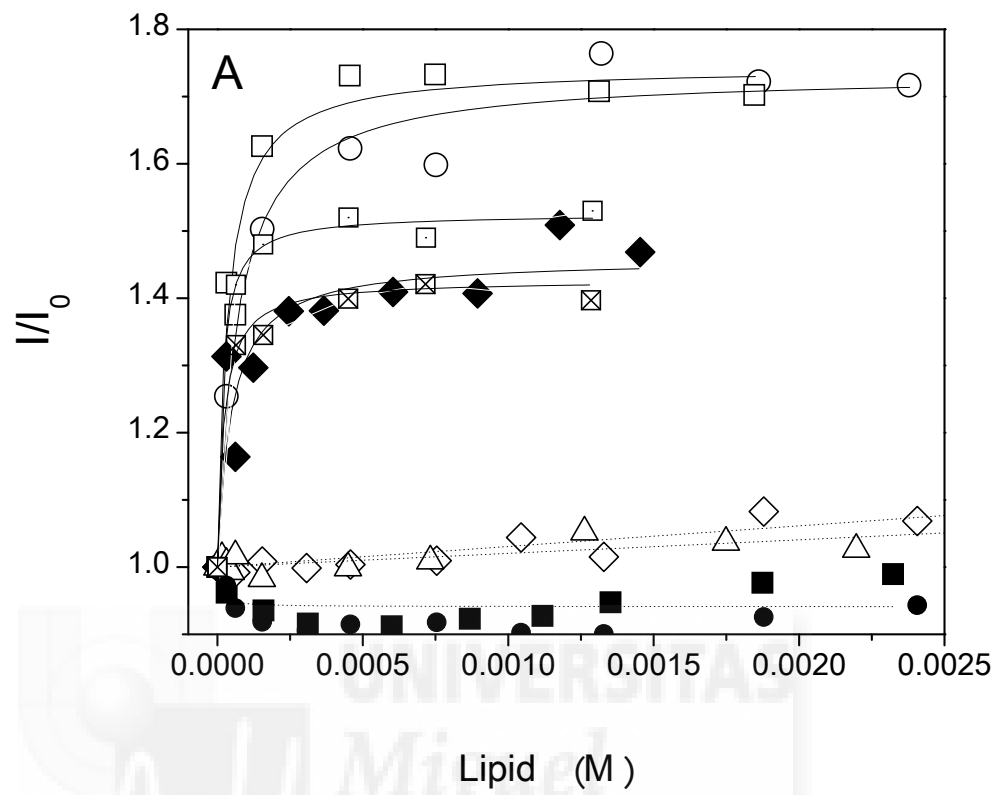
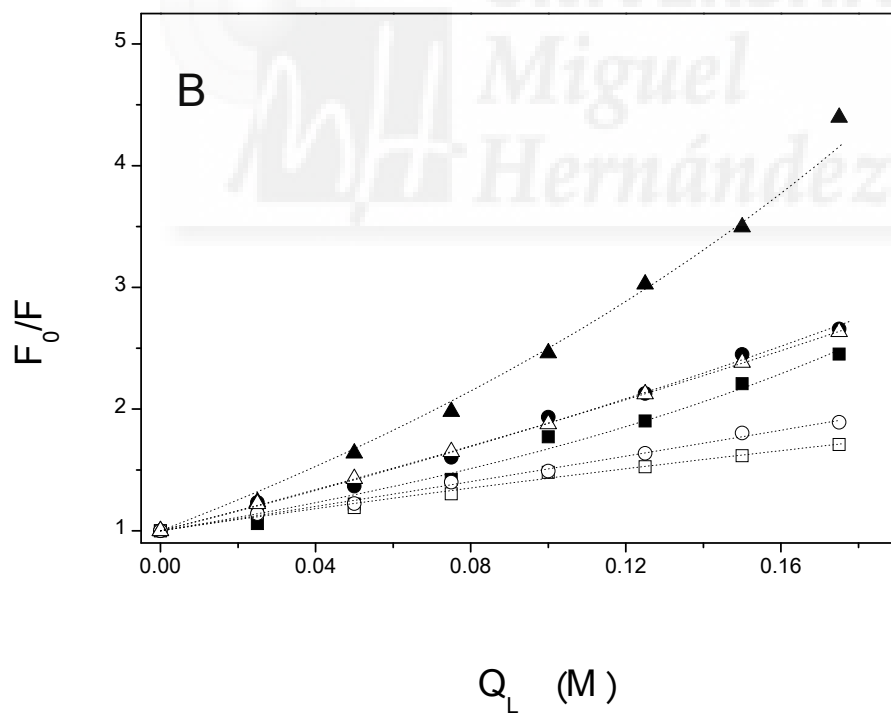
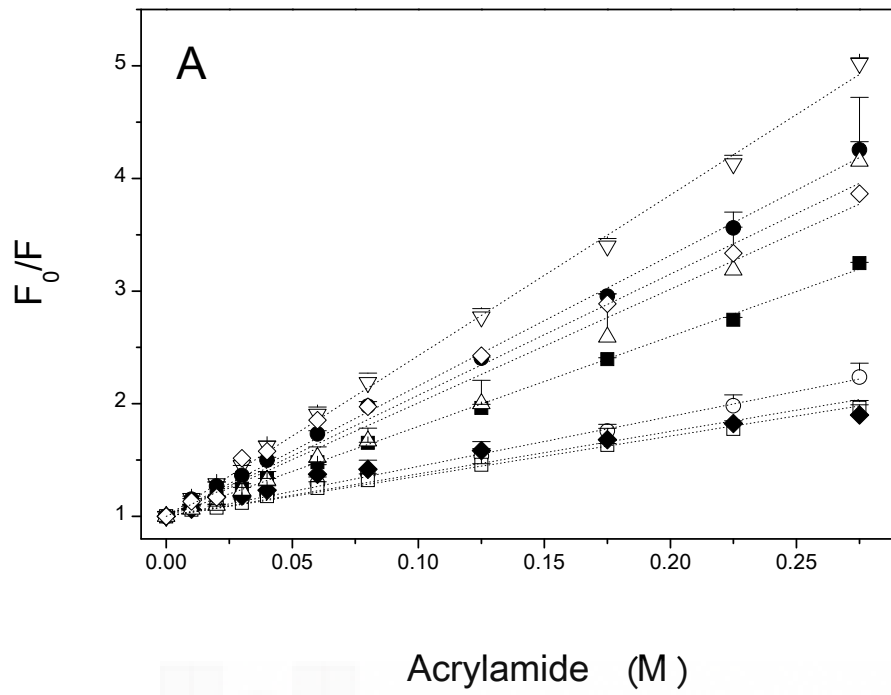


FIGURE 3



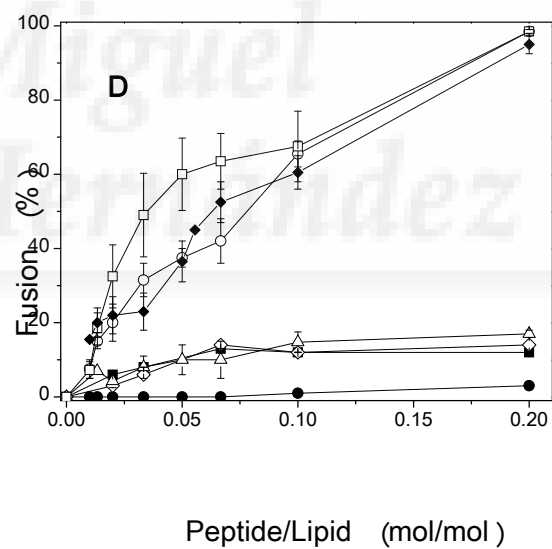
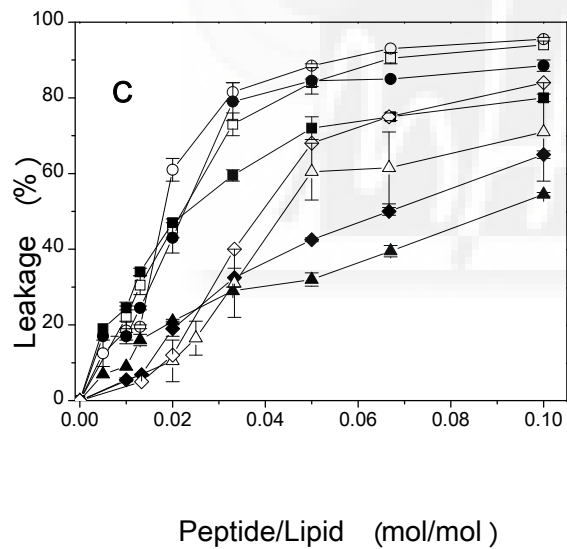
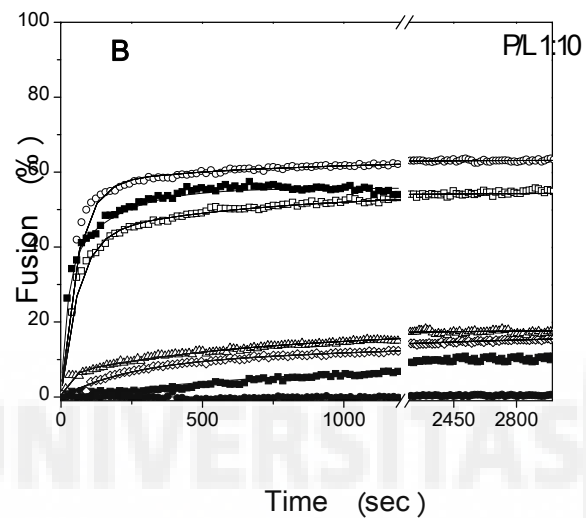
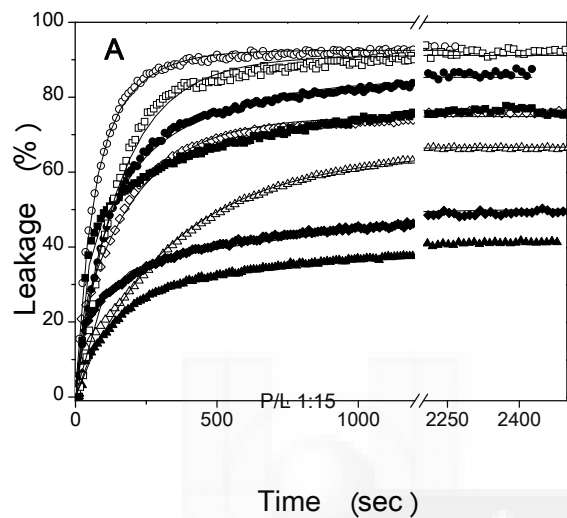
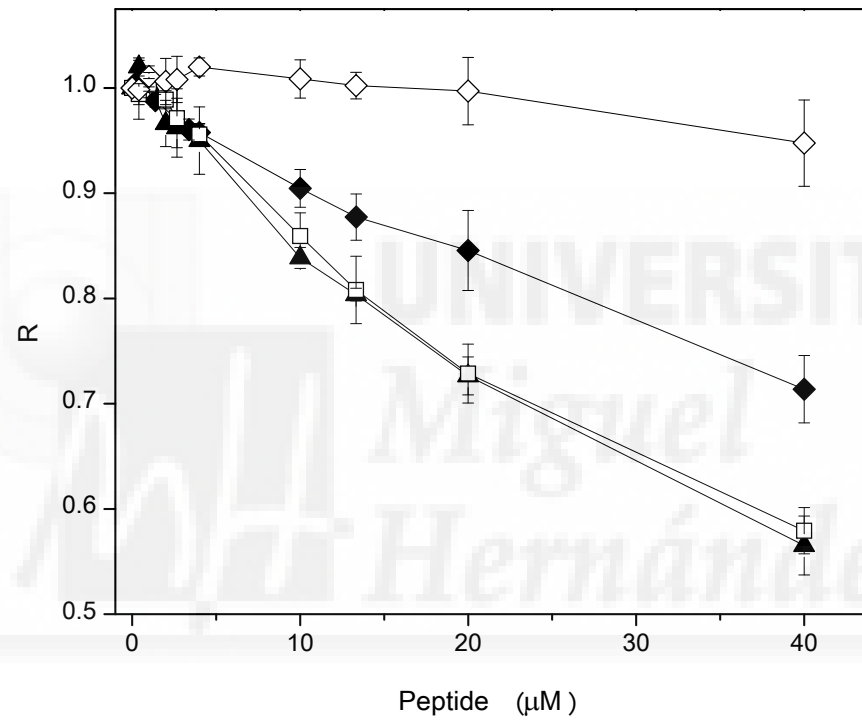


FIGURE 5



The internal membrane-active peptide from SARS-CoV S2 glycoprotein. Biophysical characterization and membrane interaction.

Jaime Guillén, Ana J. Pérez-Berná, Miguel R. Moreno, and José Villalaín

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad "Miguel Hernández", Elche-Alicante, Spain.

Virology, 2008, submitted manuscript

**THE INTERNAL MEMBRANO-ACTIVE PEPTIDE FROM SARS-COV S2
GLYCOPROTEIN. BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION AND MEMBRANE
INTERACTION.**

Jaime Guillén, Ana J. Pérez-Berná, Miguel R. Moreno, and José Villalaín*

Instituto de Biología Molecular y Celular, Campus de Elche, Universidad “Miguel
Hernández”, E-03202 Elche-Alicante, Spain

RUNNING TITLE:

Characterization of the SARS-CoV internal membrano-active peptide

*** Corresponding author:**

Dr. José Villalaín

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad “Miguel Hernández”

E-03202 Elche-Alicante, Spain

Tel +34 966 658 762

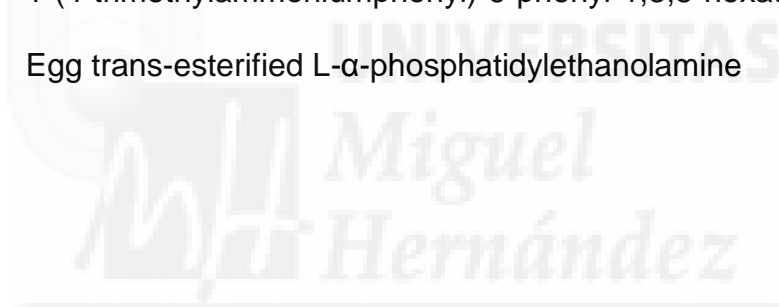
Fax +34 966 658 758

E-mail: jvillalain@umh.es

ABBREVIATIONS

BPS	Bovine brain L- α -phosphatidylserine
CD	Circular dichroism
CF	5-Carboxyfluorescein
Chol	Cholesterol
CoV	Coronavirus
di-8-ANEPPS	4-(2-(6-(Diethylamino)-2-naphthalenyl)-(ethenyl)-1-(3-sulfopropyl)-pyridinium inner salt
DMPA	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidic acid
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol
DMPS	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylserine
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene
EPA	Egg L- α -phosphatidic acid
EPC	Egg L- α -phosphatidylcholine
EPE	Egg trans-sterified L- α -phosphatidylethanolamine
EPG	Egg L- α -phosphatidylglycerol
ESM	Egg sphingomyelin
FP	Fusion peptide
HCV	Hepatitis C virus
HIV	Human immunodeficiency virus
HR	Heptad repeat region
LPC	Lyso- α -phosphatidylcholine
LUV	Large Unilamellar Vesicles

MLV	Multilamellar Vesicles
PA-DPH	3-(4-(6-Phenyl)-1,3,5-hexatrienyl)-phenylpropionic acid
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine
PTM	Pre-transmembrane domain
SARS	Severe acute respiratory syndrome
SARS _{IFP}	Putative fusion peptide of SARS
SUV	Small Lamellar Vesicles
T _m	Temperature of the gel-to-liquid crystalline phase transition
TM	Transmembrane domain
TMA-DPH	1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene
TPE	Egg trans-esterified L- α -phosphatidylethanolamine



ABSTRACT

The SARS-CoV envelope S glycoprotein is responsible for the fusion between the membranes of the virus and the target cell. The S2 domain of protein S has been suggested to have two fusion peptides, one located at its N-terminus and other, more internal, located immediately upstream the HR1. We have carried out a study of the binding and interaction with model membranes of a peptide corresponding to segment 873-888 of the SARS-CoV S glycoprotein, peptide SARS_{IFP}. We demonstrate that SARS_{IFP} binds to and interacts with phospholipid model membranes, shows a high affinity for negatively-charged phospholipids, decreases the mobility of the phospholipid acyl chains of negatively-charged phospholipids and adopts different conformations in the membrane. These data support its role in SARS-mediated membrane fusion and suggest that the region where this peptide resides might assist the fusion peptide and/or the pre-transmembrane segment of the SARS-CoV spike glycoprotein in the fusion process.

KEYWORDS: SARS; membrane fusion; spike glycoprotein; fusion peptide; peptide-membrane interaction; virus-host cell interactions; lipid bilayers.

INTRODUCTION

Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) is a newly emergent member in the family *Coronaviridae* that cause a severe infectious respiratory disease. Unlike other human coronaviruses whose infections are usually very mild, the SARS-CoV produced mortality rates as high as 10% but increased to greater than 50% in persons older than age 60 (Riley et al., 2003). Before SARS-CoV appeared, only two human coronaviruses (HCoV) were known, 229E and OC43, both causing about 30% of common colds. Since the SARS outbreak two new human coronaviruses have been identified, HCoV-NL63 (Pyrc et al., 2006; Rota et al., 2003) and HCoV-HKU1 (Birney et al., 2007), both causing potentially severe respiratory infections. Five years after its identification, many of its pathological features remain to be characterized.

SARS-CoV infection, similarly to other envelope viruses, is achieved through fusion of the lipid bilayer of the viral envelope with the host cell membrane (Qinfen et al., 2004; Simmons et al., 2004), although recent studies have shown that the entry of SARS-CoV into the cell may be also pH-dependent (Wang et al., 2008). The spike glycoprotein S, responsible for the characteristic spikes of the SARS-CoV, is a surface class I viral fusion glycoprotein that mediates viral entry by binding to the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2 (Li et al., 2003) and induces membrane fusion. SARS-CoV S glycoprotein seems to be cleaved into S1 and S2 subunits (Wu et al., 2004), but cleavage is not an absolute requirement for the mechanism of fusion (Follis, York, and Nunberg, 2006). The S1 subunit contains the receptor binding domain, whereas the S2 is responsible

for the fusion between the viral and cellular membranes (Rota et al., 2003; Xiao et al., 2003). S2 contains two predicted α -helical heptad repeat regions (HR1 and HR2, see Figure 1) of the type found in several other fusion proteins which form coiled-coil structures (Bosch et al., 2004; Bosch et al., 2003; Kliger and Levanon, 2003; Supekar et al., 2004; Xu et al., 2004). Computer sequence predictions and systematic amino acid mapping studies of the S2 domain have located the HR1 region to amino acids from approximately 892 to 972, while the HR2 region extends from amino acids from approximately 1142 to 1184 (Bosch et al., 2004; Ingallinella et al., 2004; Liu et al., 2004; Rota et al., 2003; Tripet et al., 2004; Xu et al., 2004; Zhu et al., 2004). Binding of the S1 subunit to the receptor is thought to trigger a series of conformational changes in S2 that brings, via the formation of an antiparallel heterotrimeric six-helix bundle by the two HR regions, the putative fusion peptide and the transmembrane domain in close proximity. These structural rearrangements in the S protein generate the energy that drives the fusion of the viral and cellular lipid membrane. This fusion event releases the nucleocapsid into the host cell's cytoplasm.

Membrane fusion proteins share common motifs, one of them the fusion peptide (FP), a short segment rich in hydrophobic residues essential for fusion (Horvath and Lamb, 1992; Pecheur et al., 2007). FPs also participate in inducing lipid rearrangements giving place to hemifusion and pore formation (Colotto and Epanand, 1997; Siegel and Epanand, 1997) and are also involved in pore enlargement. In addition to classical FPs, different regions of the viral envelope glycoproteins are essential for membrane fusion to occur. These membrane-interacting regions are capable of modifying the biophysical properties of phospholipid membranes,

suggesting that several segments may have a role in the fusion process (Ben-Efraim et al., 1999; Epand et al., 1999; Ghosh et al., 1998; Moreno, Giudici, and Villalain, 2006; Moreno et al., 2007; Moreno, Pascual, and Villalain, 2004; Samuel and Shai, 2001; Yu, King, and Shin, 1994). Although it has been predicted that the sequence comprising residues from 858 to 886 of the S2 domain of the SARS-CoV spike glycoprotein is the FP domain (Bosch et al., 2004; Guillen et al., 2005), recent studies have shown that the region comprising residues 770 to 788 has a much more potent fusogenic activity than the former sequence and suggested to be the S2 FP (Sainz et al., 2005). However, biophysical and mutagenesis studies have shown the importance of the 858-886 region, revealing its essential role in the spike glycoprotein mediated cell fusion: apart from having membrane-perturbing capacities (Guillen et al., 2005), its mutation causes an inhibition of cell fusion by more than 70% (Petit et al., 2005).

Although much information has been obtained in recent years on membrane fusion, we do not know yet the processes and the mechanism behind virus-host cell membrane fusion. Elucidating the nature of the interactions between phospholipids, membrane proteins and peptides is essential for the understanding of the structure and function of membrane proteins, clarifying the specific roles of specific types of phospholipids in biological membranes. Based on our recent work (Guillen et al., 2005), and since this region of SARS-CoV S2 envelope glycoprotein might be involved in membrane destabilization and at the same time take part in the fusion events like a helper for the fusion peptide and/or the pre-transmembrane regions, we have selected a specific sequence from the SARS-CoV sequence, amino-acids 873 to 888, SARS_{IFP}, which we propose to be a

second putative fusion peptide of the SARS S2 spike glycoprotein. We have made an in-depth study of SARS_{IFP}, aiming to elucidate the capacity of this region to interact and disrupt membranes, and our results demonstrate that this peptide binds and interacts differently with the membrane depending on the charge of the phospholipids, and the effect on the integrity and phase behavior of the membrane also depends on specific head-group interactions. Moreover, the peptide adopts different structures depending on its environment. These results would suggest that SARS_{IFP} could be involved in the merging of the viral and target cell membranes working synergistically with the other membrane-active regions of the SARS-CoV S2 glycoprotein.



RESULTS

In Figure 1 we present the analysis of the hydrophobic moment, hydrophobicity and interfaciality distribution along the S2 glycoprotein sequence of SARS-CoV assuming it forms an α -helical wheel along the whole sequence (Guillen et al., 2005). These data display the potential surface zones that could be implicated in the modulation of membrane binding and/or protein interaction. As we have shown previously, SARS-CoV S2 includes a highly membranotropic region located immediately upstream of HR1, which is localized in a similar place as the FP of HIV gp41 glycoprotein (Moreno, Giudici, and Villalain, 2006). Since this region could be important in the membrane fusion process (Yeung, Yamanaka, and Meanwell, 2006), we present here the results of the study of the interaction of a peptide derived from this region with model membranes, the SARS_{IFP} peptide, comprising residues 873-888 (Figure 1). This sequence could behave as a second fusion peptide of the SARS S2 glycoprotein.

The SARS_{IFP} peptide contains a single tyrosine but no tryptophan. The use of intrinsic fluorescence of tyrosine is unusual to explore the interaction of peptides and proteins with lipid membranes, mainly because of the low fluorescence quantum yield, low extinction coefficient and low sensitivity to changes in the surrounding environment. Despite this fact, it is possible to use the intrinsic fluorescence and anisotropy of the tyrosine residue to study the interaction and insertion of peptides in model membranes (Poveda et al., 2003). The increase in fluorescence emission intensity of the Tyr residue of the SARS_{IFP} peptide as a function of increasing lipid concentration is shown in Figure 2A. From data fitting,

partition coefficients, K_p , were obtained for the different phospholipid composition. Large K_p values in the 10^5 - 10^6 range were obtained for model membranes containing negatively-charged phospholipids, and lower but significant values in the case of zwitterionic membranes (10^4 range). These K_p values show that the peptide a) was bound to the membrane surface with high affinity and b) interacted stronger with membranes containing negatively-charged phospholipids but also with zwitterionic ones (Pascual et al., 2005). The stronger interaction with negatively-charged phospholipid-containing membranes was also corroborated by the larger increase in anisotropy of the Tyr residue of the peptide in the presence of model membranes whereas it was invariant or even slightly decreased, possibly owing to a scatter effect at high lipid/peptide ratios, in the presence of zwitterionic ones (Figure 2B). These data would indicate a significant motional restriction of the Tyr moiety of the peptide in the presence of negatively charged membranes (Lakowicz, 1999).

To investigate the accessibility of membrane-bound SARS_{IFP} peptide to the aqueous medium, we studied the accessibility of its Tyr residue towards acrylamide, a neutral, water-soluble, highly efficient quencher, which is unable to penetrate into the hydrophobic core of the lipid bilayer. The quenching data is presented in Figure 2C and the resultant Stern-Volmer plots reveal that in aqueous solution the Tyr residue was highly exposed to the solvent that led to a more efficient quenching. However, in the presence of model membranes, the extent of quenching was significantly reduced, indicating a poor accessibility of the Tyr residue to the aqueous phase, consistent with the incorporation of the SARS_{IFP} peptide into the lipid bilayer. As expected, K_{sv} values were lower in the presence of

negatively-charged phospholipids than in the presence of zwitterionic ones (10.5-9.7 and 14.1-12.9, respectively). The linear Stern–Volmer plots with a unitary intercept indicate that the Tyr residue is fairly accessible to acrylamide, and in all cases, the quenching of the Tyr residue showed an acrylamide dependent concentration behavior, so that the Stern-Volmer dynamic quenching formalism describes accurately the data.

In order to assess the effect of the SARS_{IFP} peptide in the destabilization of membrane vesicles, we studied their effect on the release of encapsulated CF in model membranes made up of various compositions. The extent of leakage observed at different peptide to lipid molar ratios and the effect on different phospholipid compositions is shown in Figure 2D. It can be observed that SARS_{IFP} was able to induce the release of the internal contents of the liposomes in a dose-dependent manner, but the absolute values of leakage were lower than those observed for other peptides, since in no case 100% of leakage was observed (Perez-Berna et al., 2008). At the highest lipid/peptide ratio used, the highest percentage of leakage (57%) was observed for the sample containing EPC/ESM/Chol. Lower, but significant, leakage values were obtained for liposomes composed of EPC and EPG (43% and 30%, respectively). Liposomes composed of EPA and EPC/BPS/Chol were the ones that elicited the lowest leakage values, i.e., about 11% (Figure 2D). In contrast to the results shown above, the highest leakage values were found for liposomes containing zwitterionic phospholipids, indicating that the SARS_{IFP} peptide affects more significantly the integrity of membranes containing zwitterionic phospholipids rather than those containing negatively-charged ones.

The effect of the SARS_{IFP} peptide on the structural and thermotropic properties of phospholipid membranes was investigated by measuring the steady-state fluorescence anisotropy of the fluorescent probes DPH, PA-DPH and TMA-DPH (Davenport et al., 1985; Lentz, 1993; Pebay-Peyroula, Dufourc, and Szabo, 1994) incorporated into model membranes composed of saturated synthetic phospholipids as a function of temperature (Figure 3). We have used saturated phospholipids instead of unsaturated ones in order to be able to observe the phase transition of each particular phospholipid. The presence of the peptide did not induce any significant effect on the anisotropy of the fluorescent probes in the case of the neutral lipids DMPC and POPE, neither in the cooperativity of the transition nor on the anisotropy values below and above it (Figures 3A-3C and 3D-3F, respectively). However, in the case of the negative phospholipids DMPG, DMPS and DMPA, the presence of the SARS_{IFP} peptide mainly affected the anisotropy values of PA-DPH and DPH above the transition temperature. These data would indicate that SARS_{IFP} affect mainly the phospholipid acyl chains of negatively charged phospholipids in the liquid-crystalline phase but not in the gel phase, inducing a higher order in the chain packing. The fact that the anisotropy of TMA-DPH is only slightly affected is not clear. A possible explanation would be that the positively charged TMA-DPH probe could be moved away from the positive charge of the peptide, whereas this would not be the case for negatively charged (PA-DPH) and neutral (DPH) probes. However, it should not be ruled out that the effect observed on the DPH and PA-DPH anisotropy could be due to a change in the lifetime of these probes.

Although it has been shown that the incorporation of transmembrane peptides in the phospholipid palisade of the membrane can affect not only the phospholipid chain order but also inter-chain coupling, a shift in the frequency of the CH₂ and the CD₂ symmetric stretching band is a reliable index of the phase behaviour of phospholipid dispersions since it can be used to monitor the average *trans/gauche* isomerization of the system (Mantsch and McElhaney, 1991). In order to discard the possible change in the lifetimes of the DPH fluorescent probes, we have studied the perturbations exerted by the SARS_{IFP} peptide in the phospholipid acyl chain order by observing the changes in the frequency of the symmetric stretching bands of the phospholipids. The temperature dependence of the CH₂ symmetric frequency of pure DMPC is shown in Figure 4A, where a highly cooperative change at approximately 23°C was observed, corresponding to the gel-to-liquid crystalline phase transition, T_m, of the phospholipid. In the presence of the peptide, the frequency of the CH₂ symmetric stretching band frequency both below and above the T_m increased, indicating that the incorporation of the peptide increased the proportion of *gauche* isomers, more significantly above T_m, characteristic of conformationally disordered acyl chains. Moreover, a small decrease in the gel-to-liquid crystalline phase transition was observed compared with the pure phospholipids, indicating a slight perturbation of the membrane by the peptide incorporation. Similar membrane disordering effects have been described for other viral fusion peptides, like the SIV fusion peptide (Colotto et al., 1996), the feline leukaemia fusion peptide (Darkes, Davies, and Bradshaw, 1999) or the CDV fusion peptide (Aranda, Teruel, and Ortiz, 2003). Figures 4 B and 4C display the CH₂ symmetric frequency of pure DMPG and DMPA, respectively, where a decrease of the frequency was observed, characteristic of an increase of

the proportion of *trans* isomers, i.e., the hydrocarbon chains of the phospholipids were more ordered in the presence of the peptide. This decrease was observed both below and above the T_m for DMPA, but no effect on the cooperativity of the transition was observed. However, this decrease was observed only above the T_m for DMPG but jointly with a decrease in the cooperativity of the transition.

We have also studied the effect of the SARS_{IFP} peptide in phospholipid binary mixtures where the acyl chains of one phospholipid was perdeuterated (DMPC_d), and the other, either DMPG or DMPA, was not, so that it was possible to detect independent changes in each phospholipid type. The CH₂ and CD₂ symmetric stretching frequencies of DMPA and DMPC_d in the binary mixture DMPC_d/DMPA at a molar ratio of 1:1 are shown Figures 4D and 4F, whereas the CH₂ and CD₂ symmetric stretching frequencies of DMPG and DMPC_d in the binary mixture DMPC_d/DMPG at a molar ratio of 1:1 are shown in Figures 4E and 4G. In both cases, the presence of the SARS_{IFP} peptide induced a decrease in the CH₂ symmetric stretching band frequency of both DMPA and DMPG, in contrast to the little or no change in the CD₂ symmetric stretching band frequency of DMPC_d in both samples. This specific effect of the SARS_{IFP} peptide on negatively-charged phospholipids but not on the zwitterionic ones in binary phospholipid mixtures, similarly to what was found with the pure ones, confirms its specific affinity for those phospholipids.

We have used ³¹P MAS NMR to observe the mixture POPC/EPA at a molar ratio of 2:1 since the ³¹P NMR isotropic chemical shifts of both POPC and EPA headgroups are resolvable under MAS conditions. Furthermore, their spectral

intensities reflect the molar ratio of each lipid in the mixture, and in this way, we can observe the line widths of each phospholipid component in the binary mixture. As observed in Figure 4E, the chemical shifts of the ^{31}P resonances of both POPC and EPA were not different both in the absence and in the presence of the SARS_{IFP} peptide, but their line widths and relative intensities were dissimilar. In the absence of SARS_{IFP}, the ^{31}P line width at half height of POPC was 87 Hz and that of EPA was 91 Hz, but these values shifted to 80 and 181 Hz respectively when the peptide was present. These results show that specifically EPA, a negatively charged phospholipid, but not POPC, a zwitterionic one, exhibits a lower degree of mobility and/or an increased heterogeneity of the headgroup environment in the presence of the peptide (Bonev et al., 2000; Holland, McIntyre, and Alam, 2006).

The existence of structural changes on the SARS_{IFP} peptide induced by membrane binding has been studied by looking at the infrared Amide I' band located between 1700 and 1600 cm^{-1} . The infrared spectrum of the Amide I' region of the fully hydrated peptide in D_2O buffer at different temperatures is shown in Figure 5A. The spectrum was formed by different underlying components that gave place to two main bands, one of them located at about 1620 cm^{-1} and the other one at about 1644 cm^{-1} . Their intensity changed as the temperature increased, i.e., at low temperatures the more intense band appeared at 1620 cm^{-1} whereas at high temperatures the more intense band was the one located at 1644 cm^{-1} . Whereas the broad band at about 1644 cm^{-1} would correspond to a mixture of helical and unordered structures (Byler and Susi, 1986), the narrow band at about 1620 cm^{-1} accompanied by high wavenumber counterparts at 1680–1685 cm^{-1} would correspond to self-aggregated peptides forming a intermolecular

network of hydrogen-bonded β -structures (Arrondo and Goni, 1999). The infrared spectra in the Amide I' region of the SARS_{IFP} peptide in the presence of DMPC, DMPG, and DMPA at phospholipid/peptide molar ratios of 15:1 are shown in Figures 5B-5D, respectively. The Amide I' region of the peptide in the presence of DMPC was very similar to that one of the peptide in solution, whereas it was significantly different in the presence of both DMPG and DMPA, since in the last case there was a main band at 1618 cm^{-1} with low intensity bands at about 1628 cm^{-1} and 1655 cm^{-1} . It is interesting to note that the Amide I' region of the peptide in the presence of the negatively-charged phospholipids did not change with temperature. In addition, we tested the effect of an increased phospholipid/peptide molar ratio in order to check the influence of the lipid to peptide ratio on the secondary structure of the peptide (Figures 5E-5G). As observed in the figures, the bands at approximately 1620 and 1680 cm^{-1} disappeared at high lipid to peptide ratios, from which it can be inferred that a peptide disaggregation occurred. In the case of DMPG and DMPA there were no significant changes observed (not shown). These results imply that the secondary structure of the SARS_{IFP} peptide was affected by the phospholipid composition of the membrane.

The secondary structure of the SARS_{IFP} peptide was also analyzed by circular dichroism in different lipid mimetic media (Figure 6). In aqueous buffer the predominant structures were unordered and β -strand structures, in accordance with the infrared data shown above. The presence of increasing concentrations of TFE induced an increase of the content of α -helical structure (about 75% at 60% TFE, see Figure 6A). A similar behavior was observed at increasing concentrations of SDS (about 55% α -helical structure at 4mM SDS and LPC at a

phospholipid-to-peptide ratio of 50:1, see Figures 6B and 6C, respectively). These data show the great flexibility and capability of the SARS_{IFP} peptide to adopt different structures depending on the surrounding media, which it could be important in an energetically unfavorable process as membrane fusion is.



DISCUSSION

The fusion of the viral and cellular membranes is mediated by envelope fusion glycoproteins located on the outer surface of the viral membranes. Whereas class I membrane fusion proteins possess a fusion peptide at or near the amino terminus and a high α -helical content, class II fusion proteins possess an internal fusion peptide located at a distal location from the transmembrane anchor, as well as different domains comprised mostly of antiparallel β -sheets (Kielian and Rey, 2006; Schibli and Weissenhorn, 2004). Their three dimensional structure is different but their function is identical, so that they must share structural and functional characteristics in specific domains which interact with and disrupt biological membranes. Coronavirus spike proteins have many of the characteristics of the class I fusion proteins. Trimers of the S protein protrude from the virion envelope, giving place to its characteristic corona-like appearance. Like other class I fusion proteins, they have two HR regions in the S2 membrane subunit (Liu et al., 2004), which assemble into a stable, anti-parallel hetero-trimeric six-helix bundle (Bosch et al., 2003; Ingallinella et al., 2004). Similar to what has been found for other class I fusion proteins, such a conformation in the full length structure implies a co-localization of the fusion peptide predicted to occur N-terminally of HR1 and the viral transmembrane anchor, located C-terminally of HR2. This common structure is thought to facilitate membrane fusion by bringing the target membrane and viral membrane together. SARS-CoV S protein has a large ectodomain, more similar to the paramyxovirus envelope glycoproteins than to the orthomyxovirus and retrovirus. So, additional membrane binding regions seems to be necessary to complete the fusion process. In fact, a number of

research work on membrane fusion proteins point out that there are several regions within these proteins that are involved in the fusion process, and are decisive for membrane fusion to take place (Peisajovich and Shai, 2003). Based on our recent work (Guillen et al., 2005), we have selected a specific sequence from the SARS-CoV S2 sequence, amino-acids 873 to 888, SARS_{IFP}, which we propose to be a second putative fusion peptide of the SARS spike glycoprotein. Consequently, we have made a comprehensive study of peptide SARS_{IFP} characterizing its binding and interaction with model membrane systems.

The selected sequence of this work has been shown to have membrane-active properties in our recent work (Guillen et al., 2005); accordingly, the SARS_{IFP} peptide studied in this work displays a high binding constant to model membranes having different phospholipid compositions as it has been found for other peptides (Bernabeu et al., 2007; Moreno et al., 2007). SARS_{IFP} showed a higher affinity for anionic-phospholipid compositions than those containing zwitterionic phospholipids. The existence of a specific interaction with liposomes containing negatively-charged phospholipids was corroborated by hydrophilic probe quenching, suggesting that the SARS_{IFP} peptide was effectively incorporated in the membranes. Nevertheless, the SARS_{IFP} peptide is capable of binding with high affinity to model membranes containing both negatively-charged and zwitterionic phospholipids. SARS_{IFP} was also capable of disrupting the membrane bilayer causing the release of fluorescent probes. This effect was dependent on the lipid composition and on the lipid/peptide molar ratio, being the highest effect observed for liposomes containing zwitterionic phospholipids. Lower but significant values were observed for liposomes containing negatively charged phospholipids. This

effect could be due to the strong interaction between the peptide and the negatively charged phospholipids, resulting in peptide aggregation and consequently low leakage values.

We have also shown that SARS_{IFP} peptide is capable of affecting the steady state fluorescence anisotropy of fluorescent probes located in the membrane, since the peptide was able of decreasing the mobility of the phospholipid acyl chains of negatively-charged phospholipids above but not below T_m when compared to the pure phospholipids. This specific effect on negatively-charged phospholipids was corroborated by monitoring the frequency of the symmetric stretching bands of the phospholipid acyl chains, even in binary mixtures of negatively-charged and zwitterionic phospholipids. Additionally, we showed by MAS-NMR that that the phosphate group of negatively-charged phospholipid in binary mixtures displayed a lower degree of mobility in the presence of the SARS_{IFP} peptide. Even so, the peptide has a disordering and perturbing effect in zwitterionic phospholipids, in agreement with the leakage data. The infrared spectra of the Amide I' region of the fully hydrated peptide did change with temperature, indicating a low stability of its conformation, where a mixture of α -helix, random and aggregated structures coexisted. Interestingly, we have observed differences on the proportion of the different secondary elements when the peptide was incorporated into membranes of different phospholipid compositions and different peptide-to-lipid molar ratios. Whereas the secondary structure content of the peptide was similar in solution and in the presence of the zwitterionic phospholipid DMPC, it changed significantly in the presence of both DMPC and DMPA, where aggregated structures predominated. Furthermore, CD

data reveal that the peptide can adopt a high α -helical content in the presence of lipid mimetic systems. These data suggest that the presence of different phospholipid molecules can modulate the secondary structure of the peptide as it has been suggested for other peptides from membrane fusion proteins (Contreras et al., 2001; Korazim, Sackett, and Shai, 2006; Pascual et al., 2005; Pascual, Moreno, and Villalain, 2005). These characteristics would indicate that SARS_{IFP} would interact with the membrane through both electrostatic and hydrophobic effects, as well as it would be adsorbed at the membrane interface changing its conformation depending on the phospholipid headgroups; however, it would be possible that part of the peptide could be inserted deeper than the membrane interface, increasing in this way the membrane permeability. In summary, SARS_{IFP} would interact with negatively-charged phospholipids forming β -sheet aggregates accompanied by an increment in phospholipid acyl chain order and head group mobility restriction. However, in the absence of negatively-charged phospholipids, the peptide would acquire a predominant helical or random conformation and would interact in a more hydrophobic way with the zwitterionic phospholipids, being located in a shallow position with the membrane compromising its integrity. This model should be similar to that suggested in other studies using antimicrobial peptides and amyloid peptides (Bokvist et al., 2004; Rinaldi et al., 2004; Zhao et al., 2002). Although great progress has been made in the knowledge of the SARS-CoV since its discovery five years ago, many aspects of its molecular mechanism are still not totally understood. In this respect, it is outstanding that there is no specific drug or vaccine available to fight against it. This and other segments of the SARS-CoV S2 protein are very attractive candidates for antiviral drug development as well as provide new information for anti-viral drug research.

MATERIALS AND METHODS

Materials and reagents. A 16-residue peptide pertaining to the S2 domain of SARS-CoV (873 GAALQIPFAMQMAYRF 888 , with N-terminal acetylation and C-terminal amidation) was obtained from Genemed Synthesis, San Francisco, CA. The peptide was purified by reverse-phase HPLC (Vydac C-8 column, 250 x 4.6 mm, flow rate 1 ml/min, solvent A, 0.1% trifluoroacetic acid, solvent B, 99.9 acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) to better than 95% purity, and its composition and molecular mass were confirmed by amino acid analysis and mass spectroscopy. Since trifluoroacetate has a strong infrared absorbance at approximately $1,673\text{ cm}^{-1}$, which interferes with the characterization of the peptide amide I band (Contreras et al., 2001), residual trifluoroacetic acid, used both in peptide synthesis and in the high-performance liquid chromatography mobile phase, was removed by several lyophilization-solubilization cycles in 10 mM HCl. Egg phosphatidylcholine (EPC), egg phosphatidylglycerol (EPG), egg phosphatidic acid (EPA), egg sphingomyelin (ESM), bovine brain phosphatidylserine (BPS), egg trans-sterified phosphatidylethanolamine (EPE), bovine liver phosphatidylinositol (BPI), 1,2-dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), 1,2-dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG), 1,2-dimyristoylphosphatidylserine (DMPS), 1,2-dimyristoylphosphatidic acid (DMPA), Chol (Chol), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), lyso- α -phosphatidylcholine (LPC) and 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). 5-Carboxyfluorescein (CF),

(>95% by HPLC), deuterium oxide (99.9% by atom), Triton X-100, EDTA, and HEPES were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, ES). 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), 3-[p-(6-phenyl)-1,3,5-hexatrienyl]-phenylpropionic acid (PA-DPH) and 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). All other reagents used were of analytical grade from Merck (Darmstadt, Germany). Water was deionized, twice-distilled and passed through a Milli-Q equipment (Millipore Ibérica, Madrid) to a resistivity higher than 18 M Ω cm.

Vesicle preparation. Aliquots containing the appropriate amount of lipid in chloroform/methanol (2:1, v/v) were placed in a test tube, the solvents removed by evaporation under a stream of O₂-free nitrogen, and finally, traces of solvents were eliminated under vacuum in the dark for more than 3 h. The lipid films were resuspended in an appropriate buffer and incubated either at 25°C or 10°C above the phase transition temperature (T_m) with intermittent vortexing for 30 min to hydrate the samples and obtain multilamellar vesicles (MLV). The samples were frozen and thawed five times to ensure complete homogenization and maximization of peptide/lipid contacts with occasional vortexing. Large unilamellar vesicles (LUV) with a mean diameter of 0.1 μ m for CF leakage experiments were prepared from multilamellar vesicles by the extrusion method (Mayer, Hope, and Cullis, 1986) using polycarbonate filters with a pore size of 0.1 μ m (Nuclepore Corp., Cambridge, CA, USA). Small unilamellar vesicles (SUV) were prepared from MLVs using a Branson 250 sonifier (40W) equipped with a microtip until the suspension became completely transparent. Every 30 s, the samples were cooled for 90 s in ice to prevent overheating of the solution. The titanium particles

released from the tip were removed by centrifugation at 15000 rpm at room temperature for 15 min. The phospholipid and peptide concentration were measured by methods described previously (Böttcher, Van Gent, and Fries, 1961; Edelhoch, 1967).

Membrane leakage measurement. LUVs with a mean diameter of 0.1 μm were prepared as indicated above in buffer containing 10 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 7.4, and CF at a concentration of 40 mM. Non-encapsulated CF was separated from the vesicle suspension through a filtration column containing Sephadex G-75 (Pharmacia, Uppsala, SW, EU), eluted with buffer containing 10 mM TRIS, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4. Leakage of intraliposomal CF was assayed by treating the probe-loaded liposomes (final lipid concentration, 0.125 mM) with the appropriate amounts of peptide on microtiter plates using a microplate reader (FLUOstar; BMG Labtech, Offenburg, Germany), each well containing a final volume of 170 μl stabilized at 25°C. The medium in the microtiter plates was continuously stirred to allow the rapid mixing of peptide and vesicles. One hundred percent release was achieved by adding Triton X-100 to the microtiter plates to a final concentration of 0.5% (wt/wt). Fluorescence measurements were made initially with probe-loaded liposomes, then by adding peptide solution, and finally one hundred percent release was achieved by adding Triton X-100 to the microtiter plates (final concentration of 0.5% (wt/wt)). For details see refs. (Bernabeu et al., 2007; Moreno et al., 2007)

Peptide binding to vesicles. The partitioning of the peptide into the phospholipid bilayer was monitored by the fluorescence enhancement of tyrosine by successive

additions of small volumes of SUV to the peptide sample (5.4×10^{-5} M). Fluorescence spectra were recorded in a SLM Aminco 8000C spectrofluorometer with excitation and emission wavelengths of 282 and 304 nm, respectively, and 4 nm spectral bandwidths. Measurements were carried out in 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, EDTA 0.1 mM, pH 7.4. Intensity values were corrected for dilution, and the scatter contribution was derived from lipid titration of a vesicle blank. The data were analyzed as previously described (Moreno et al., 2007).

Steady state fluorescence anisotropy. MLVs were formed in 100 mM NaCl, 0.05 mM EDTA and 25 mM HEPES, pH 7.4. Aliquots of TMA-DPH, PA-DPH or DPH in N,N'-dimethylformamide (2×10^{-4} M) were directly added into the lipid dispersion to obtain a probe/lipid molar ratio of 1/500. Samples were incubated for 15, 45 or 60 min when TMA-DPH, PA-DPH or DPH were used, respectively, 10°C above the gel to liquid-crystalline phase transition temperature T_m of the phospholipid mixture. Afterwards, the peptides were added to obtain a peptide/lipid molar ratio of 1:15 and incubated 10°C above the T_m of each lipid for one hour, with occasional vortexing. All fluorescence studies were carried using 5 mm x 5 mm quartz cuvettes in a final volume of 400 μl (315 μM lipid concentration). All the data were corrected for background intensities and progressive dilution. The steady state fluorescence anisotropy, $\langle r \rangle$, was measured with an automated polarization accessory using a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrometer, coupled to a Peltier device for automatic temperature change. The data were analyzed as previously described (Moreno et al., 2007).

Fluorescence quenching of Tyr emission by acrylamide. For acrylamide quenching assays, aliquots from a 4 M solution of the water-soluble quencher were added to the solution-containing peptide (5.4×10^{-5} M) in the presence and absence of liposomes at a peptide/lipid molar ratio of 1:100. The results obtained were corrected for dilution and the scatter contribution was derived from acrylamide titration of a vesicle blank. The data were analyzed according to the Stern-Volmer equation (Eftink and Ghiron, 1977), $I_0/I = 1 + K_{sv}[Q]$, where I_0 and I represent the fluorescence intensities in the absence and the presence of the quencher [Q], respectively, and K_{sv} is the Stern-Volmer quenching constant.

Infrared spectroscopy. For infrared spectroscopy, the samples were prepared as above but in D₂O buffer. Approximately 25 μ l of a pelleted sample in D₂O buffer containing 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4 was placed between two CaF₂ windows separated by 50- μ m thick Teflon spacers in a liquid demountable cell (Harrick, Ossining, NY). The spectra were obtained in a Bruker IFS55 spectrometer using a deuterated triglycine sulfate detector. Each spectrum was obtained by collecting 200 interferograms with a nominal resolution of 2 cm^{-1} , transformed using triangular apodization and, in order to average background spectra between sample spectra over the same time period, a sample shuttle accessory was used to obtain sample and background spectra. The spectrometer was continuously purged with dry air at a dew point of -40°C in order to remove atmospheric water vapour from the bands of interest. All samples were equilibrated at the lowest temperature for 20 min before acquisition. An external bath circulator, connected to the infrared spectrometer, controlled the sample temperature. For temperature studies, samples were scanned using 2°C intervals

and a 2-min delay between each consecutive scan. The data were analyzed as previously described (Bernabeu et al., 2007; Moreno et al., 2007).

Magic angle spinning (MAS) ^{31}P NMR. Samples were prepared as described above and concentrated by centrifugation (14000 rpm for 15 min). MAS ^{31}P NMR spectra were acquired on a Bruker 500 MHz Avance spectrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) using a Bruker 4-mm broad band MAS probe under both static and MAS conditions. The samples were packed into 4-mm zirconia rotors and placed in the spinning module of the MAS probe; no cross-polarization was used. The spinning speed was 9 kHz, regulated to ± 3 Hz by a Bruker pneumatic unit and the temperature was 25°C. A single ^{31}P 90° pulse (typically 5 μs) was used for excitation, a gated broadband decoupling of 10 W, 32k data points, 1600 transients and 5 s delay time between acquisitions. Under static conditions, the samples showed a broad asymmetrical signal with a low-frequency peak and a high-frequency shoulder characteristic of bilayer structures (data not shown).

Circular Dichroism measurements. CD spectra were recorded at 25 °C using a JASCO-810 spectropolarimeter in a 2 mm path-length quartz cell. An external bath circulator Neslab RTE-111, connected to the spectropolarimeter, controlled the sample temperature. Wavelength spectra were acquired every 0.2 nm at a scan speed of 50 nm·min⁻¹ with a response time of 2 s and averaged over five scans from 250 to 190 nm, with a band width of 2 nm. Secondary structure predictions were estimated using the CDPro program suite (SELCON3, CONTIN/LL, and CDSSTR) (Sreerama and Woody, 2000; Sreerama and Woody, 2004a; Sreerama

and Woody, 2004b). Spectra were corrected for the blank. Samples contained 40 μM of peptide in 10 mM phosphate buffer at pH 7.4. Different concentrations of TFE, SDS and LPC were added to the corresponding peptide samples.



ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant BFU2005-00186-BMC (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) to J.V. A.J.P. and J.G. are recipients of pre-doctoral fellowships from the Autonomous Government of the Valencian Community, Spain. We are especially grateful to Ana I. Gómez-Sánchez for her excellent technical assistance.



REFERENCES

- Aranda, F. J., Teruel, J. A., and Ortiz, A. (2003). Interaction of a synthetic peptide corresponding to the N-terminus of canine distemper virus fusion protein with phospholipid vesicles: a biophysical study. *Biochim Biophys Acta* **1618**(1), 51-8.
- Arrondo, J. L., and Goni, F. M. (1999). Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Prog Biophys Mol Biol* **72**(4), 367-405.
- Ben-Efraim, I., Kliger, Y., Hermesh, C., and Shai, Y. (1999). Membrane-induced step in the activation of Sendai virus fusion protein. *J Mol Biol* **285**(2), 609-25.
- Bernabeu, A., Guillen, J., Perez-Berna, A. J., Moreno, M. R., and Villalain, J. (2007). Structure of the C-terminal domain of the pro-apoptotic protein Hrk and its interaction with model membranes. *Biochim Biophys Acta* **1768**(6), 1659-70.
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., Kuehn, M. S., Taylor, C. M., Neph, S., Koch, C. M., Asthana, S., Malhotra, A., Adzhubei, I., Greenbaum, J. A., Andrews, R. M., Flicek, P., Boyle, P. J., Cao, H., Carter, N. P., Clelland, G. K., Davis, S., Day, N., Dhami, P., Dillon, S. C., Dorschner, M. O., Fiegler, H., Giresi, P. G., Goldy, J., Hawrylycz, M., Haydock, A., Humbert, R., James, K. D., Johnson, B. E., Johnson, E. M., Frum, T. T., Rosenzweig, E. R., Karnani, N., Lee, K., Lefebvre, G. C., Navas, P. A., Neri, F., Parker, S. C., Sabo, P. J., Sandstrom, R., Shafer, A., Vetrie, D., Weaver, M., Wilcox, S., Yu, M., Collins, F. S., Dekker, J., Lieb, J. D., Tullius, T. D., Crawford, G. E., Sunyaev, S., Noble, W. S., Dunham, I., Denoeud, F., Reymond, A., Kapranov, P., Rozowsky, J., Zheng, D., Castelo, R., Frankish, A., Harrow, J., Ghosh, S., Sandelin, A., Hofacker, I. L., Baertsch, R., Keefe, D., Dike, S., Cheng, J., Hirsch, H. A., Sekinger, E. A., Lagarde, J., Abril, J. F., Shahab, A., Flamm, C., Fried, C., Hacker, J., Hertel, J., Lindemeyer, M., Missal, K., Tanzer, A., Washietl, S., Korb, J., Emanuelsson, O., Pedersen, J. S., Holroyd, N., Taylor, R., Swarbreck, D., Matthews, N., Dickson, M. C., Thomas, D. J., Weirauch, M. T., Gilbert, J., Drenkow, J., Bell, I., Zhao, X., Srinivasan, K. G., Sung, W. K., Ooi, H. S., Chiu, K. P., Foissac, S., Alioto, T., Brent, M., Pachter, L., Tress, M. L., Valencia, A., Choo, S. W., Choo, C. Y., Ucla, C., Manzano, C., Wyss, C., Cheung, E., Clark, T. G., Brown, J. B., Ganesh, M., Patel, S., Tammana, H., Chrast, J., Henrichsen, C. N., Kai, C., Kawai, J., Nagalakshmi, U., Wu, J., Lian, Z., Lian, J., Newburger, P., Zhang, X., Bickel, P., Mattick, J. S., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Weissman, S., Hubbard, T., Myers, R. M., Rogers, J., Stadler, P. F., Lowe, T. M., Wei, C. L., Ruan, Y., Struhl, K., Gerstein, M., Antonarakis, S. E., Fu, Y., Green, E. D., Karaoz, U., Siepel, A., Taylor, J., Liefer, L. A., Wetterstrand, K. A., Good, P. J., Feingold, E. A., Guyer, M. S., Cooper, G. M., Asimenos, G., Dewey, C. N., Hou, M., Nikolaev, S., Montoya-Burgos, J. I., Loytynoja, A., Whelan, S., Pardi, F.,

Massingham, T., Huang, H., Zhang, N. R., Holmes, I., Mullikin, J. C., Ureta-Vidal, A., Paten, B., Seringhaus, M., Church, D., Rosenbloom, K., Kent, W. J., Stone, E. A., Batzoglou, S., Goldman, N., Hardison, R. C., Haussler, D., Miller, W., Sidow, A., Trinklein, N. D., Zhang, Z. D., Barrera, L., Stuart, R., King, D. C., Ameer, A., Enroth, S., Bieda, M. C., Kim, J., Bhinge, A. A., Jiang, N., Liu, J., Yao, F., Vega, V. B., Lee, C. W., Ng, P., Shahab, A., Yang, A., Moqtaderi, Z., Zhu, Z., Xu, X., Squazzo, S., Oberley, M. J., Inman, D., Singer, M. A., Richmond, T. A., Munn, K. J., Rada-Iglesias, A., Wallerman, O., Komorowski, J., Fowler, J. C., Couttet, P., Bruce, A. W., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Langford, C. F., Nix, D. A., Euskirchen, G., Hartman, S., Urban, A. E., Kraus, P., Van Calcar, S., Heintzman, N., Kim, T. H., Wang, K., Qu, C., Hon, G., Luna, R., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Aldred, S. F., Cooper, S. J., Halees, A., Lin, J. M., Shulha, H. P., Zhang, X., Xu, M., Haidar, J. N., Yu, Y., Ruan, Y., Iyer, V. R., Green, R. D., Wadelius, C., Farnham, P. J., Ren, B., Harte, R. A., Hinrichs, A. S., Trumbower, H., Clawson, H., Hillman-Jackson, J., Zweig, A. S., Smith, K., Thakkapallayil, A., Barber, G., Kuhn, R. M., Karolchik, D., Armengol, L., Bird, C. P., de Bakker, P. I., Kern, A. D., Lopez-Bigas, N., Martin, J. D., Stranger, B. E., Woodroffe, A., Davydov, E., Dimas, A., Eyraes, E., Hallgrimsdottir, I. B., Huppert, J., Zody, M. C., Abecasis, G. R., Estivill, X., Bouffard, G. G., Guan, X., Hansen, N. F., Idol, J. R., Maduro, V. V., Maskeri, B., McDowell, J. C., Park, M., Thomas, P. J., Young, A. C., Blakesley, R. W., Muzny, D. M., Sodergren, E., Wheeler, D. A., Worley, K. C., Jiang, H., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., Graves, T., Fulton, R., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Clamp, M., Cuff, J., Gnerre, S., Jaffe, D. B., Chang, J. L., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S., Koriabine, M., Nefedov, M., Osoegawa, K., Yoshinaga, Y., Zhu, B., and de Jong, P. J. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**(7146), 799-816.

- Bokvist, M., Lindstrom, F., Watts, A., and Grobner, G. (2004). Two types of Alzheimer's beta-amyloid (1-40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation. *J Mol Biol* **335**(4), 1039-49.
- Bonev, B. B., Chan, W. C., Bycroft, B. W., Roberts, G. C., and Watts, A. (2000). Interaction of the lantibiotic nisin with mixed lipid bilayers: a ³¹P and ²H NMR study. *Biochemistry* **39**(37), 11425-33.
- Bosch, B. J., Martina, B. E., Van Der Zee, R., Lepault, J., Haijema, B. J., Versluis, C., Heck, A. J., De Groot, R., Osterhaus, A. D., and Rottier, P. J. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22), 8455-60.
- Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A., and Rottier, P. J. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol* **77**(16), 8801-11.

- Böttcher, C. S. F., Van Gent, C. M., and Fries, C. (1961). A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Anal Chim Acta* **1061**, 203-204.
- Byler, D. M., and Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* **25**(3), 469-87.
- Colotto, A., and Eband, R. M. (1997). Structural study of the relationship between the rate of membrane fusion and the ability of the fusion peptide of influenza virus to perturb bilayers. *Biochemistry* **36**(25), 7644-51.
- Colotto, A., Martin, I., Ruysschaert, J. M., Sen, A., Hui, S. W., and Eband, R. M. (1996). Structural study of the interaction between the SIV fusion peptide and model membranes. *Biochemistry* **35**(3), 980-9.
- Contreras, L. M., Aranda, F. J., Gavilanes, F., Gonzalez-Ros, J. M., and Villalain, J. (2001). Structure and interaction with membrane model systems of a peptide derived from the major epitope region of HIV protein gp41: implications on viral fusion mechanism. *Biochemistry* **40**(10), 3196-207.
- Darkes, M. J., Davies, S. M., and Bradshaw, J. P. (1999). X-ray diffraction study of feline leukemia virus fusion peptide and lipid polymorphism. *FEBS Lett* **461**(3), 178-82.
- Davenport, L., Dale, R. E., Bisby, R. H., and Cundall, R. B. (1985). Transverse location of the fluorescent probe 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in model lipid bilayer membrane systems by resonance excitation energy transfer. *Biochemistry* **24**(15), 4097-108.
- Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**(7), 1948-54.
- Eftink, M. R., and Ghiron, C. A. (1977). Exposure of tryptophanyl residues and protein dynamics. *Biochemistry* **16**(25), 5546-51.
- Eband, R. F., Macosko, J. C., Russell, C. J., Shin, Y. K., and Eband, R. M. (1999). The ectodomain of HA2 of influenza virus promotes rapid pH dependent membrane fusion. *J Mol Biol* **286**(2), 489-503.
- Follis, K. E., York, J., and Nunberg, J. H. (2006). Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. *Virology* **350**(2), 358-69.
- Ghosh, J. K., Peisajovich, S. G., Ovadia, M., and Shai, Y. (1998). Structure-function study of a heptad repeat positioned near the transmembrane domain of Sendai virus fusion protein which blocks virus-cell fusion. *J Biol Chem* **273**(42), 27182-90.
- Guillen, J., Perez-Berna, A. J., Moreno, M. R., and Villalain, J. (2005). Identification of the membrane-active regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike membrane glycoprotein using a 16/18-mer peptide scan: implications for the viral fusion mechanism. *J Virol* **79**(3), 1743-52.
- Holland, G. P., McIntyre, S. K., and Alam, T. M. (2006). Distinguishing individual lipid headgroup mobility and phase transitions in raft-forming lipid mixtures with ³¹P MAS NMR. *Biophys J* **90**(11), 4248-60.

- Horvath, C. M., and Lamb, R. A. (1992). Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J Virol* **66**(4), 2443-55.
- Ingallinella, P., Bianchi, E., Finotto, M., Cantoni, G., Eckert, D. M., Supekar, V. M., Bruckmann, C., Carfi, A., and Pessi, A. (2004). Structural characterization of the fusion-active complex of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23), 8709-14.
- Kielian, M., and Rey, F. A. (2006). Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol* **4**(1), 67-76.
- Kliger, Y., and Levanon, E. Y. (2003). Cloaked similarity between HIV-1 and SARS-CoV suggests an anti-SARS strategy. *BMC Microbiol* **3**, 20.
- Korazim, O., Sackett, K., and Shai, Y. (2006). Functional and structural characterization of HIV-1 gp41 ectodomain regions in phospholipid membranes suggests that the fusion-active conformation is extended. *J Mol Biol* **364**(5), 1103-17.
- Lakowicz, J. (1999). "Principles of Fluorescence Spectroscopy." Kluwer-Plenum Press, New York.
- Lentz, B. R. (1993). Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chem Phys Lipids* **64**(1-3), 99-116.
- Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H., and Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**(6965), 450-4.
- Liu, S., Xiao, G., Chen, Y., He, Y., Niu, J., Escalante, C. R., Xiong, H., Farmar, J., Debnath, A. K., Tien, P., and Jiang, S. (2004). Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet* **363**(9413), 938-47.
- Mantsch, H. H., and McElhaney, R. N. (1991). Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem Phys Lipids* **57**(2-3), 213-26.
- Mayer, L. D., Hope, M. J., and Cullis, P. R. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta* **858**(1), 161-8.
- Moreno, M. R., Giudici, M., and Villalain, J. (2006). The membranotropic regions of the endo and ecto domains of HIV gp41 envelope glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1758**(1), 111-23.
- Moreno, M. R., Guillen, J., Perez-Berna, A. J., Amoros, D., Gomez, A. I., Bernabeu, A., and Villalain, J. (2007). Characterization of the Interaction of Two Peptides from the N Terminus of the NHR Domain of HIV-1 gp41 with Phospholipid Membranes. *Biochemistry* **46**(37), 10572-84.
- Moreno, M. R., Pascual, R., and Villalain, J. (2004). Identification of membrane-active regions of the HIV-1 envelope glycoprotein gp41 using a 15-mer gp41-peptide scan. *Biochim Biophys Acta* **1661**(1), 97-105.

- Pascual, R., Contreras, M., Fedorov, A., Prieto, M., and Villalain, J. (2005). Interaction of a peptide derived from the N-heptad repeat region of gp41 Env ectodomain with model membranes. Modulation of phospholipid phase behavior. *Biochemistry* **44**(43), 14275-88.
- Pascual, R., Moreno, M. R., and Villalain, J. (2005). A peptide pertaining to the loop segment of human immunodeficiency virus gp41 binds and interacts with model biomembranes: implications for the fusion mechanism. *J Virol* **79**(8), 5142-52.
- Pebay-Peyroula, E., Dufourc, E. J., and Szabo, A. G. (1994). Location of diphenyl-hexatriene and trimethylammonium-diphenyl-hexatriene in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers by neutron diffraction. *Biophys Chem* **53**(1-2), 45-56.
- Pecheur, E. I., Lavillette, D., Alcaras, F., Molle, J., Boriskin, Y. S., Roberts, M., Cosset, F. L., and Polyak, S. J. (2007). Biochemical mechanism of hepatitis C virus inhibition by the broad-spectrum antiviral arbidol. *Biochemistry* **46**(20), 6050-9.
- Peisajovich, S. G., and Shai, Y. (2003). Viral fusion proteins: multiple regions contribute to membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* **1614**(1), 122-9.
- Perez-Berna, A. J., Guillen, J., Moreno, M. R., Bernabeu, A., Pabst, G., Laggner, P., and Villalain, J. (2008). Identification of the membrane-active regions of HCV p7 protein. Biophysical characterization of the loop region. *J Biol Chem*.
- Petit, C. M., Melancon, J. M., Chouljenko, V. N., Colgrove, R., Farzan, M., Knipe, D. M., and Kousoulas, K. G. (2005). Genetic analysis of the SARS-coronavirus spike glycoprotein functional domains involved in cell-surface expression and cell-to-cell fusion. *Virology* **341**(2), 215-30.
- Poveda, J. A., Prieto, M., Encinar, J. A., Gonzalez-Ros, J. M., and Mateo, C. R. (2003). Intrinsic tyrosine fluorescence as a tool to study the interaction of the shaker B "ball" peptide with anionic membranes. *Biochemistry* **42**(23), 7124-32.
- Pyrk, K., Bosch, B. J., Berkhout, B., Jebbink, M. F., Dijkman, R., Rottier, P., and van der Hoek, L. (2006). Inhibition of human coronavirus NL63 infection at early stages of the replication cycle. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(6), 2000-8.
- Qinfen, Z., Jinming, C., Xiaojun, H., Huanying, Z., Jicheng, H., Ling, F., Kunpeng, L., and Jingqiang, Z. (2004). The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J Med Virol* **73**(3), 332-7.
- Riley, S., Fraser, C., Donnelly, C. A., Ghani, A. C., Abu-Raddad, L. J., Hedley, A. J., Leung, G. M., Ho, L. M., Lam, T. H., Thach, T. Q., Chau, P., Chan, K. P., Lo, S. V., Leung, P. Y., Tsang, T., Ho, W., Lee, K. H., Lau, E. M., Ferguson, N. M., and Anderson, R. M. (2003). Transmission dynamics of the etiological agent of SARS in Hong Kong: impact of public health interventions. *Science* **300**(5627), 1961-6.
- Rinaldi, T. A., Tersariol, I. L., Dyszy, F. H., Prado, F. M., Nascimento, O. R., Di Mascio, P., and Nantes, I. L. (2004). Protonation of two adjacent tyrosine residues

- influences the reduction of cytochrome c by diphenylacetaldehyde: a possible mechanism to select the reducer agent of heme iron. *Free Radic Biol Med* **36**(6), 802-10.
- Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M. H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C., Burns, C., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A. D., Drosten, C., Pallansch, M. A., Anderson, L. J., and Bellini, W. J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**(5624), 1394-9.
- Sainz, B., Jr., Rausch, J. M., Gallaher, W. R., Garry, R. F., and Wimley, W. C. (2005). Identification and characterization of the putative fusion peptide of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein. *J Virol* **79**(11), 7195-206.
- Samuel, O., and Shai, Y. (2001). Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses. *Biochemistry* **40**(5), 1340-9.
- Schibli, D. J., and Weissenhorn, W. (2004). Class I and class II viral fusion protein structures reveal similar principles in membrane fusion. *Mol Membr Biol* **21**(6), 361-71.
- Siegel, D. P., and Epand, R. M. (1997). The mechanism of lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions in phosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms. *Biophys J* **73**(6), 3089-111.
- Simmons, G., Reeves, J. D., Rennekamp, A. J., Amberg, S. M., Piefer, A. J., and Bates, P. (2004). Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(12), 4240-5.
- Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**(2), 252-60.
- Sreerama, N., and Woody, R. W. (2004a). Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol* **383**, 318-51.
- Sreerama, N., and Woody, R. W. (2004b). On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Sci* **13**(1), 100-12.
- Supekar, V. M., Bruckmann, C., Ingallinella, P., Bianchi, E., Pessi, A., and Carfi, A. (2004). Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(52), 17958-63.
- Tripet, B., Howard, M. W., Jobling, M., Holmes, R. K., Holmes, K. V., and Hodges, R. S. (2004). Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core. *J Biol Chem* **279**(20), 20836-49.

- Wang, H., Yang, P., Liu, K., Guo, F., Zhang, Y., Zhang, G., and Jiang, C. (2008). SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Res* **18**(2), 290-301.
- Wu, X. D., Shang, B., Yang, R. F., Yu, H., Ma, Z. H., Shen, X., Ji, Y. Y., Lin, Y., Wu, Y. D., Lin, G. M., Tian, L., Gan, X. Q., Yang, S., Jiang, W. H., Dai, E. H., Wang, X. Y., Jiang, H. L., Xie, Y. H., Zhu, X. L., Pei, G., Li, L., Wu, J. R., and Sun, B. (2004). The spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) is cleaved in virus infected Vero-E6 cells. *Cell Res* **14**(5), 400-6.
- Xiao, X., Chakraborti, S., Dimitrov, A. S., Gramatikoff, K., and Dimitrov, D. S. (2003). The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. *Biochem Biophys Res Commun* **312**(4), 1159-64.
- Xu, Y., Zhu, J., Liu, Y., Lou, Z., Yuan, F., Liu, Y., Cole, D. K., Ni, L., Su, N., Qin, L., Li, X., Bai, Z., Bell, J. I., Pang, H., Tien, P., Gao, G. F., and Rao, Z. (2004). Characterization of the heptad repeat regions, HR1 and HR2, and design of a fusion core structure model of the spike protein from severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Biochemistry* **43**(44), 14064-71.
- Yeung, K. S., Yamanaka, G. A., and Meanwell, N. A. (2006). Severe acute respiratory syndrome coronavirus entry into host cells: Opportunities for therapeutic intervention. *Med Res Rev* **26**(4), 414-33.
- Yu, Y. G., King, D. S., and Shin, Y. K. (1994). Insertion of a coiled-coil peptide from influenza virus hemagglutinin into membranes. *Science* **266**(5183), 274-6.
- Zhao, H., Rinaldi, A. C., Di Giulio, A., Simmaco, M., and Kinnunen, P. K. (2002). Interactions of the antimicrobial peptides temporins with model biomembranes. Comparison of temporins B and L. *Biochemistry* **41**(13), 4425-36.
- Zhu, J., Xiao, G., Xu, Y., Yuan, F., Zheng, C., Liu, Y., Yan, H., Cole, D. K., Bell, J. I., Rao, Z., Tien, P., and Gao, G. F. (2004). Following the rule: formation of the 6-helix bundle of the fusion core from severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein and identification of potent peptide inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **319**(1), 283-8.

LEGENDS TO THE FIGURES

FIGURE 1. Positive bilayer-to-water transfer free-energy values (shaded areas) for the hydrophobic moment (HM), hydrophobicity (H), and interfaciality (I) distribution along the SARS-CoV spike S2 protein, assuming it forms an α -helical wheel (see ref (Guillen et al., 2005) for details), as well as a schematic view of the organization of SARS-CoV spike glycoprotein S2 (amino acid residues 758 to 1255 for the full length), showing the approximate structural and functional regions: The fusion domain FP, the predicted heptad repeat regions HR1 and HR2, the pre and transmembrane domains (PTM and TM) and the relative position of the peptide used in this study (SARS_{IFP}). The exact location of the SARS_{IFP} in the bidimensional plots is marked by dots.

FIGURE 2. Change on the fluorescence intensity (A) and steady-state anisotropy (B) of the Tyr residue of the SARS_{IFP} peptide in the presence of increasing lipid concentrations, (C) Stern-Volmer plots of the quenching of the Tyr fluorescence emission of SARS_{IFP} by acrylamide in aqueous buffer (∇), and in the presence of liposomes and (D) effect of the SARS_{IFP} peptide on CF leakage in LUVs at different lipid-to-peptide molar ratios. The lipid compositions used were EPG (\blacksquare), EPA (\blacktriangle), EPC (\blacklozenge), EPC/BPS/Chol at a molar ratio of 5:3:1 (\bullet) and EPC/ESM/CHOL at a molar ratio of 5:3:1 (\blacktriangledown).

FIGURE 3. Steady-state anisotropy, $\langle r \rangle$, of TMA-DPH (A, D, G, J and M), PA-DPH (B, E, H, K and N) and DPH (C, F, I, L and O) incorporated into model membranes composed of (A, B and C) DMPC, (D, E and F) POPE, (G, H and I)

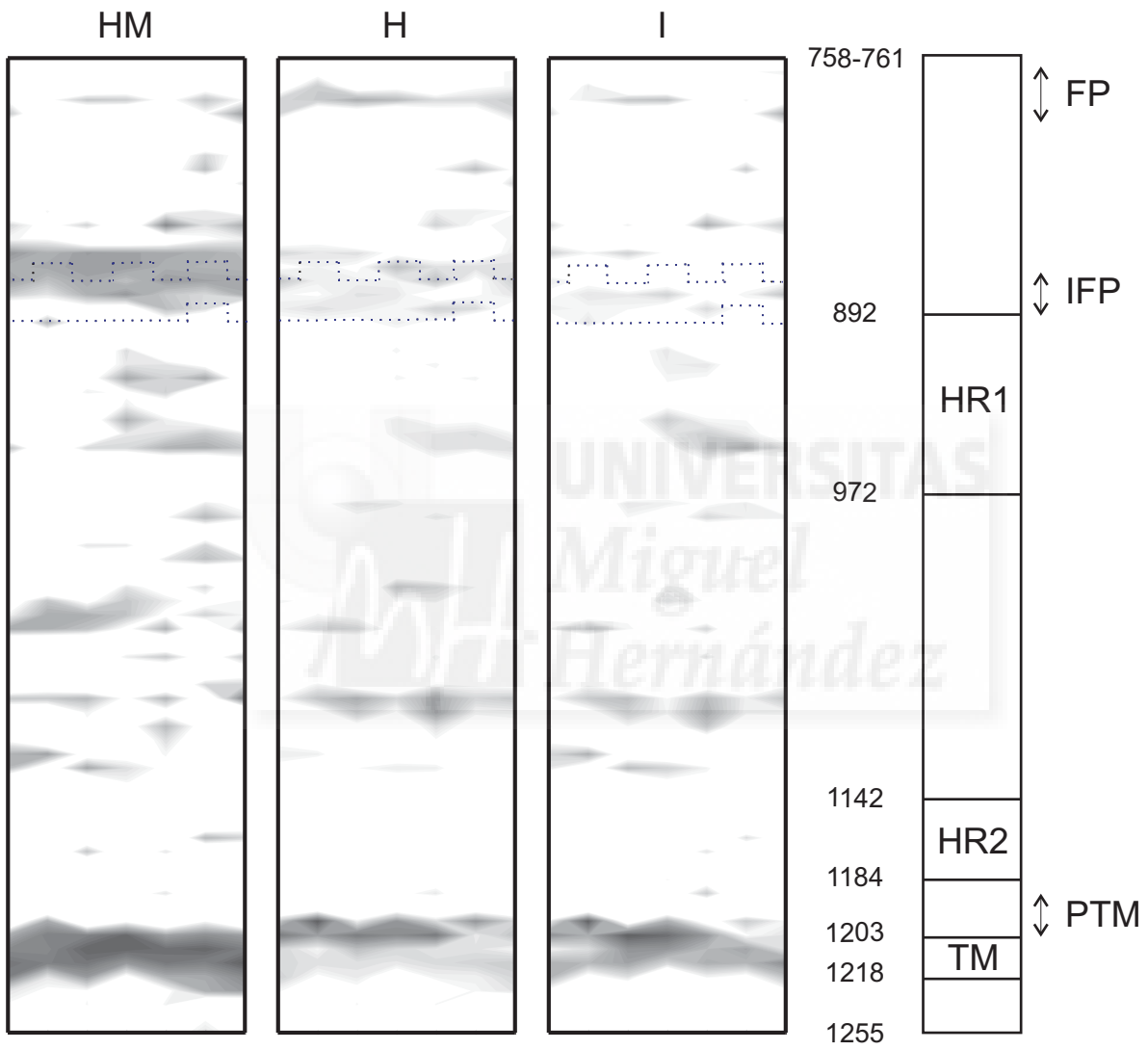
DMPG, (J, K and L) DMPS and (M, N and O) DMPA model membranes as a function of temperature. Data correspond to vesicles in the absence (\circ) and in the presence of the SARS_{IFP} peptide (\bullet).

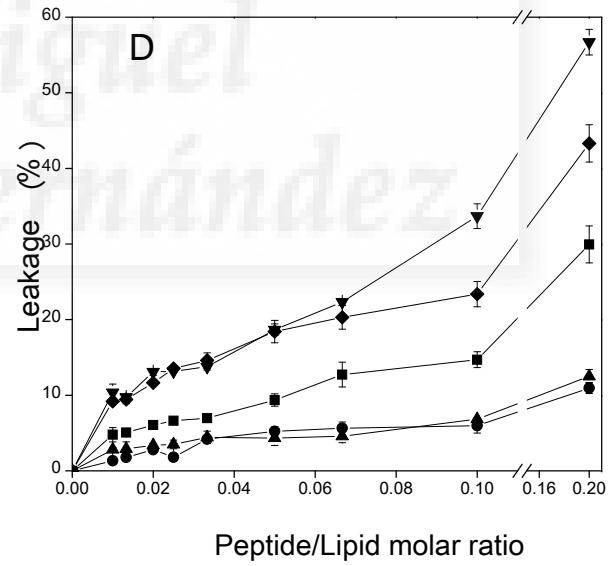
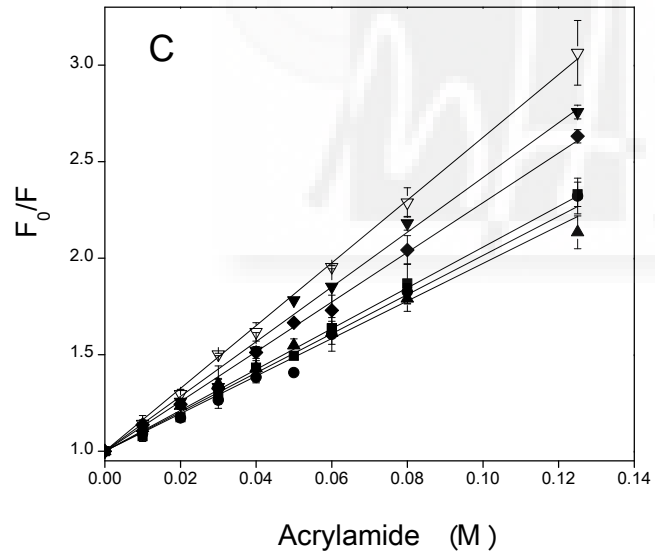
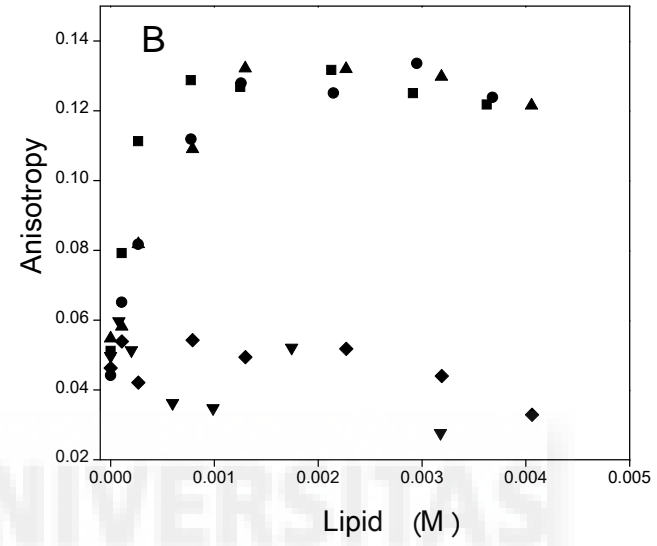
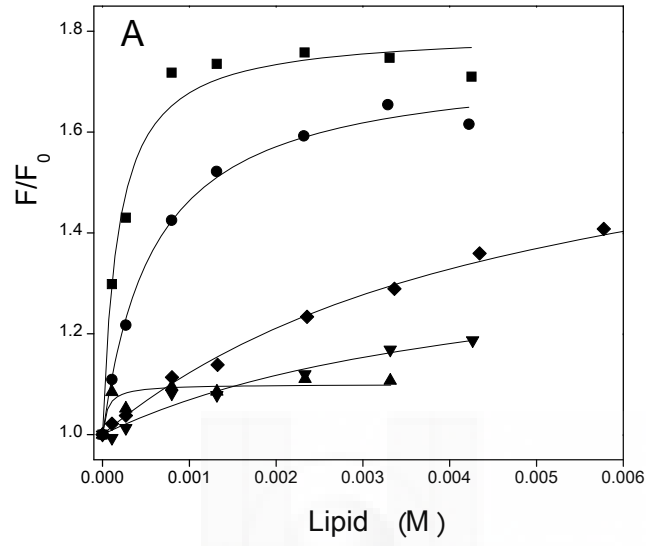
FIGURE 4. Dependence with temperature of the CH₂ symmetric stretching band frequency of (A) pure DMPC, (B) pure DMPG, (C) pure DMPA, (D) DMPA in an equimolar mixture of DMPC_d/DMPA, (E) DMPG in an equimolar mixture of DMPC_d/DMPG, and the CD₂ symmetric stretching band frequency of (F) DMPC_d in an equimolar mixture of DMPC_d/DMPA and (G) DMPC_d in an equimolar mixture of DMPC_d/DMPG, in the absence (\circ) and in the presence of SARS_{IFP} peptide (\bullet) at a phospholipid/peptide molar ratio of 15:1. (E) ³¹P-MAS NMR at 25° C and 9 kHz spinning speed (500 MHz proton frequency) spectra for POPC/EPA (2:1 molar ratio) in the absence (....) and in the presence of the SARS_{IFP} peptide at a phospholipid /molar ratio of 20:1 (—).

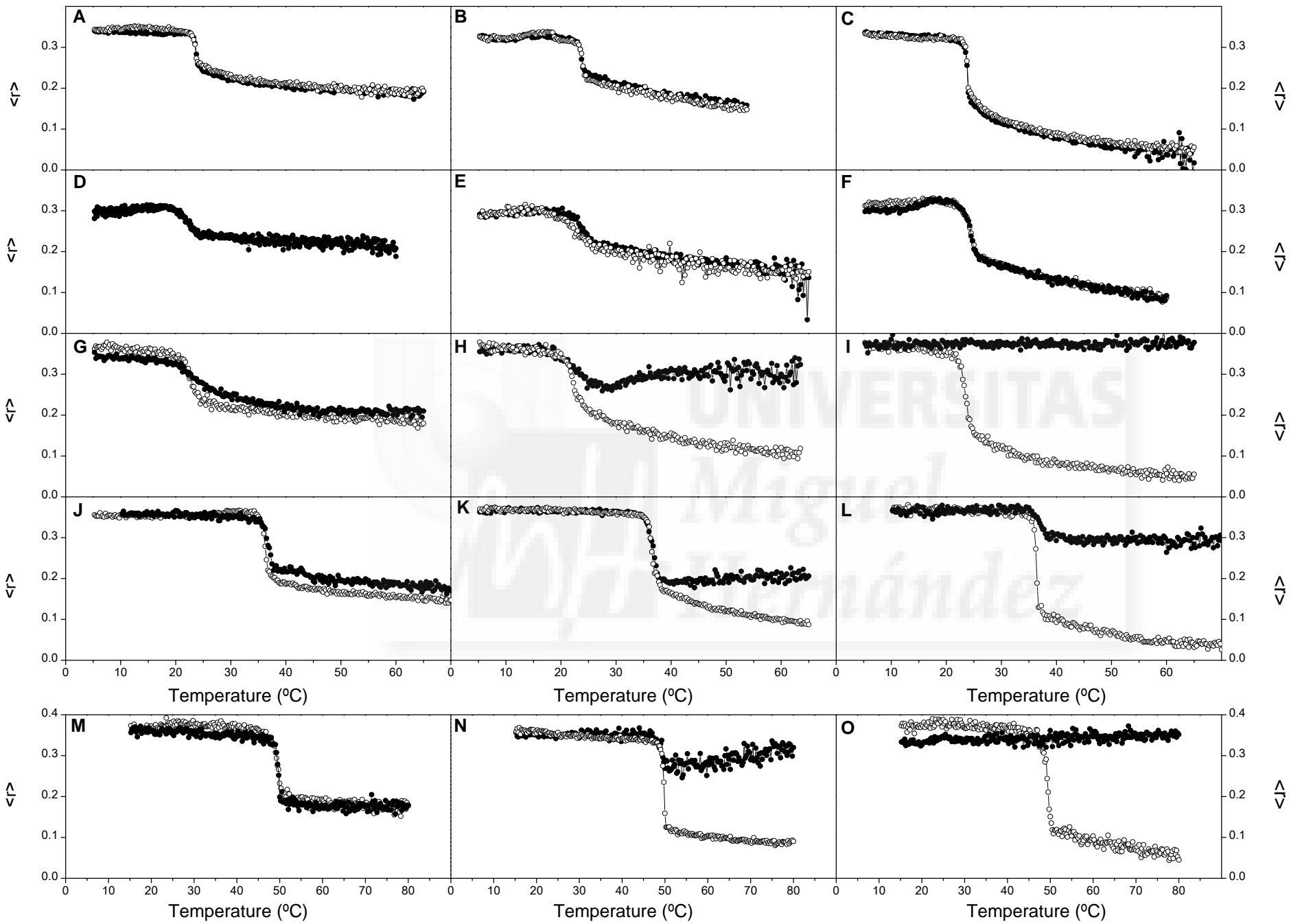
FIGURE 5. Stacked infrared spectra of the Amide I' and C=O regions of samples containing the SARS_{IFP} peptide in solution (A) and in the presence of DMPC (B), DMPG (C) and DMPA (D) at different temperatures as indicated. The phospholipid-to-peptide molar ratio was 15:1. Spectra of the Amide I' region of the SARS_{IFP} peptide in the presence of DMPC at a phospholipid/peptide molar ratio of (E) 15:1, (F) 75:1 and (G) 100:1, taken at T_m+10°C.

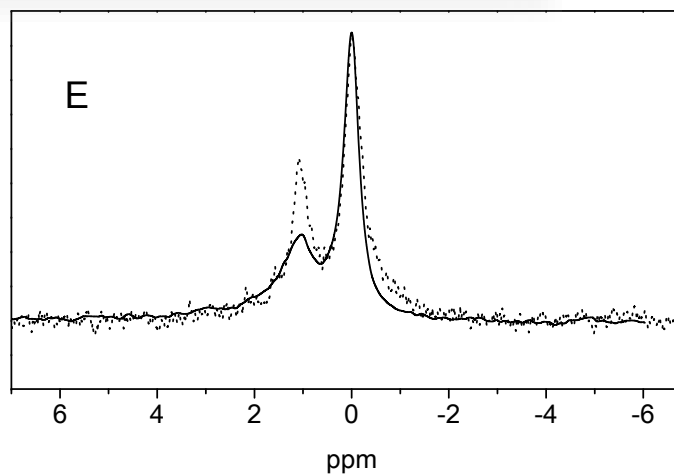
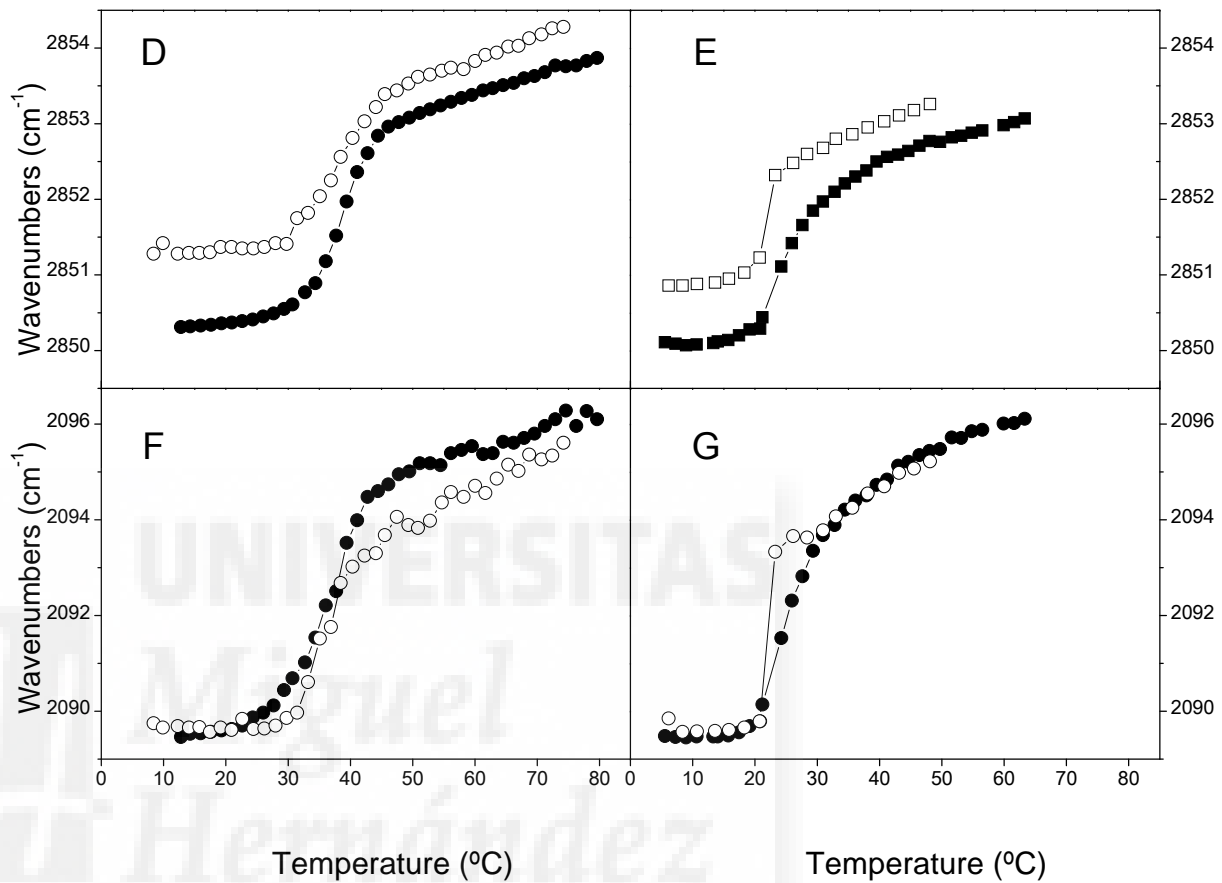
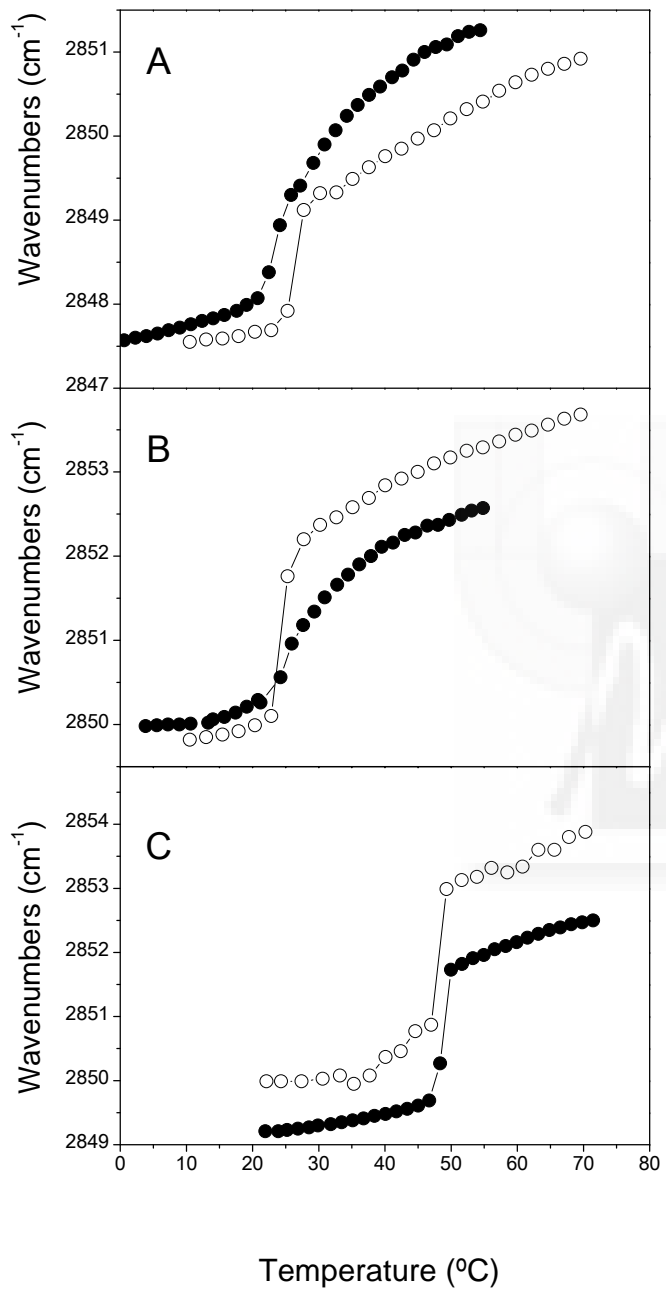
FIGURE 6. CD spectra of the SARS_{IFP} peptide in TFE (A), SDS (B) and LPC (C). The percentages of TFE, the SDS concentration in mM, and the LPC-to-peptide ratio are indicated. The temperature was 25 °C.

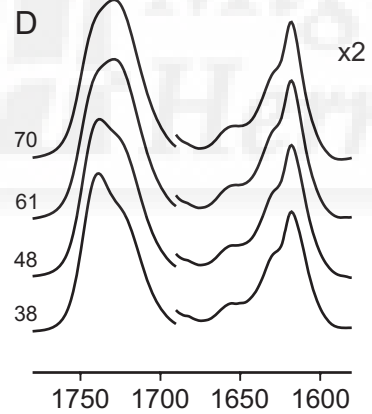
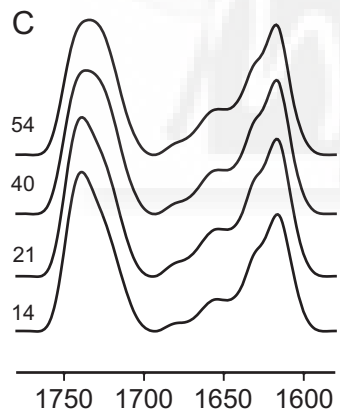
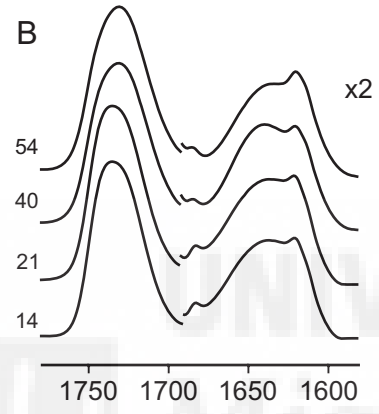
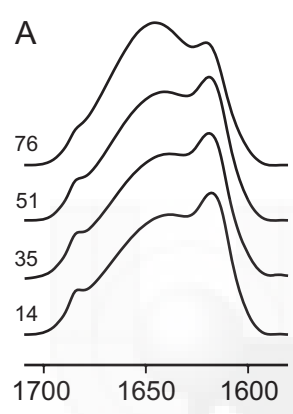


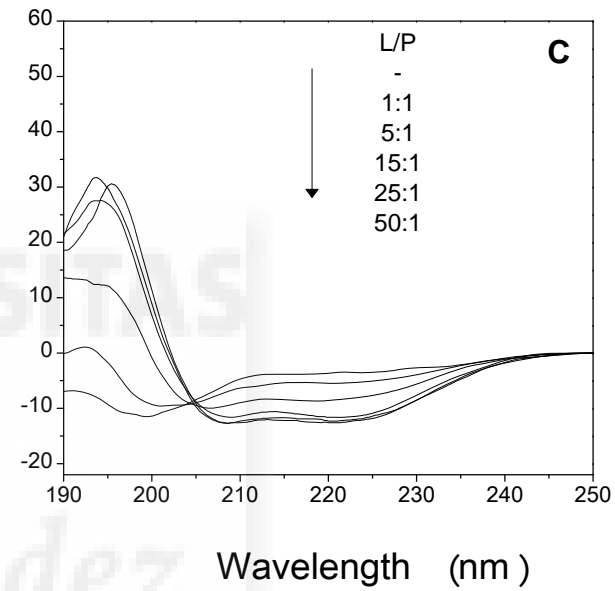
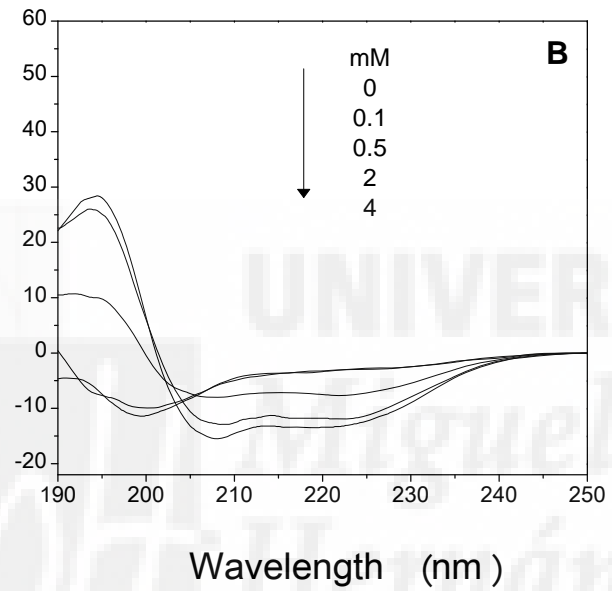
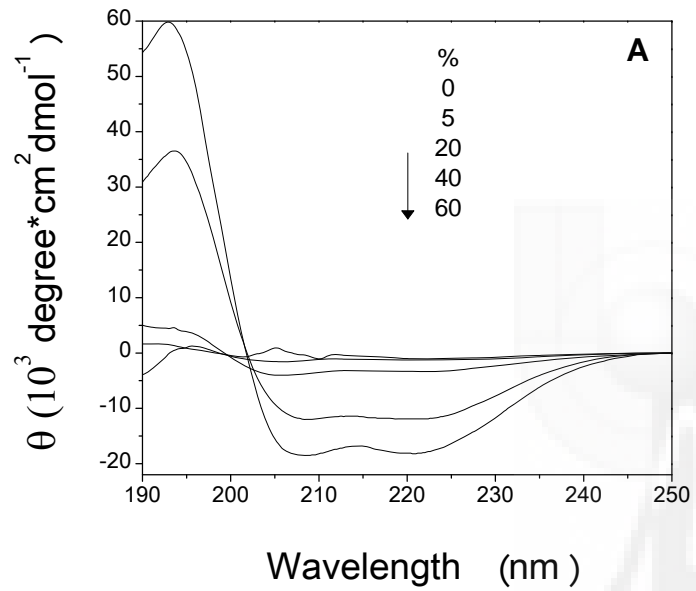












Publicaciones surgidas a lo largo de esta Tesis.

Guillén J., Bernabeu A, Shapiro S and Villalaín J.

Location and orientation of Triclosan in phospholipid model membranes.

Eur Biophys J. 2004. **33(5)**, 448-453.

Guillén J., Pérez-Berná A. J., Moreno M.R. and Villalaín J.

Identification of the membrane-active regions of the severe acute respiratory coronavirus spike membrane glycoprotein using a 16/18-mer peptide scan: implications for the fusion mechanism.

Journal of Virology. 2005. **79(3)**, 1743-1752.

Pérez-Berná A. J., Moreno M.R., **Guillén J.**, Bernabeu A. and Villalaín J.

The membrane-active regions of the Hepatitis C virus E1 and envelope glycoproteins.

Biochemistry. 2006. **45(11)**, 3755-3768.

Pérez-Fons L., Aranda F.J., **Guillén J.**, Villalaín J. and Micol V.

Rosemary (Rosmarinus officinalis) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes.

Arch Biochem Biophys. 2006. **453(2)**, 224-236.

Bernabeu A, **Guillén J.**, Pérez-Berná AJ, Moreno MR, Villalaín J.

Structure of the C-terminal domain of the pro-apoptotic protein Hrk and its interaction with model membranes.

Biochim Biophys Acta. Biomembranes. 2007. **1768(6)**, 1659-1670.

Guillén J., Moreno MR, Pérez-Berná AJ, Bernabeu A and Villalaín J.

Interaction of a peptide from the pre-transmembrane domain of SARS-CoV spike protein with phospholipid membranes.

J Phys Chem B. 2007. **111**, 13714-13725.

Moreno MR, **Guillén J.**, Pérez-Berná AJ, Amorós D, Gómez AI, Bernabeu A and Villalaín J.

Characterization of the interaction of two peptides from the NHR domain of HIV gp41 with phospholipid membranes.

Biochemistry. 2007. **46**, 10572-10584.

Pérez-Berná AJ, **Guillén J.**, Moreno MR, Bernabeu A, Pabst G, Laggner P and Villalaín J.

Identification of the membrane-active regions of HCV p7 protein. Biophysical characterization of the loop region.

J Biol Chem. 2008. **283 (13)**, 8089-8101.

Moreno MR, Pérez-Berná AJ, **Guillén J.** and Villalaín J.

Biophysical characterization and membrane interaction of the most membranotropic region of the HIV-1 gp41 endodomain.

Biochim Biophys Acta. Biomembranes. 2008. (In press).

Pérez-Berná AJ, **Guillén J.**, Moreno MR, Gómez-Sánchez AI, Pabst G, Laggner P and Villalaín J.

Interaction of the most membranotropic region of the HCV E2 envelope glycoprotein with membranes. Biophysical characterization.

Biophys J. 2008. (In press).

Guillén J, de Almeida RFM, Prieto M and Villalaín J.
Structural and dynamic characterization of the interaction of the putative fusion peptide of the S2 SARS-CoV virus protein with lipid membranes.
J Phys Chem B. 2008. (Accepted manuscript)

Pérez-Berná AJ, Bernabeu A, Moreno MR, **Guillén J**, and Villalaín J.
The pre-transmembrane region of the HCV E1 envelope glycoprotein. Interaction with model membranes.
Biochim Biophys Acta. Biomembranes. 2008. (Accepted manuscript).

Pérez-Berná AJ, **Guillén J**, Moreno MR and Villalaín J.
"Membranotropic regions of membrane-fusion proteins. The use of peptide libraries".
Libro: Membrane-active peptides: methods and results on structure and function. (Ed. M.R.C. Castanho), IUL La Jolla, California. 2008.

Guillén J, Pérez-Berná AJ, Moreno MR and Villalaín J.
The internal membrane-active peptide from SARS-CoV S2 glycoprotein. Biophysical characterization and membrane interaction.
Virology. 2008. (Submitted manuscript).

Guillén J, Pérez-Berná AJ, Moreno MR, Kinnunen PK and Villalaín J.
Membrane-active peptides of SARS-CoV S2 glycoprotein.
(Manuscript in preparation).

Guillén J, Almeida RFM, Pérez-Berná AJ, Kinnunen PK, Prieto M and Villalaín J.
A peptide pertaining to the loop segment of SARS-CoV S2 glycoprotein binds and interacts with model biomembranes.
(Manuscript in preparation).

DATOS PERSONALES

Apellidos: Guillén Casas

Nombre: Jaime

DN/Pasaporte: 48360701-G Fecha de nacimiento: : 10/07/1980

Sexo: Hombre

Nacionalidad: Española

SITUACIÓN PROFESIONAL ACTUAL

Organismo: Universidad Miguel Hernández de Elche

Facultad, Escuela o Instituto: Instituto de Biología Molecular y Celular

Depto./Unidad: Bioquímica y Biología Molecular

Dirección postal: Avda. Universidad s/n Ed. Torregaitán Universidad Miguel Hernandez Elche (Alicante)

País: España

Teléfono (indicar prefijo, número y extensión): +34 966658951

Fax: +34 966658758

Correo electrónico: jguillen@umh.es; j_guillen1980@hotmail.com

Especialización (Códigos UNESCO): 230299

Categoría profesional: Becario investigación

Fecha de inicio: 1/04/2004

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Biomembranas, biofísica, fusión membranas, proteínas de fusión virales, interacción péptido-membrana

FORMACIÓN ACADÉMICA

<i>Titulación Superior</i>	<i>Centro</i>	<i>Fecha</i>
Licenciado en Bioquímica	Universidad Miguel Hernández de Elche	30/06/2002

<i>Doctorado</i>	<i>Centro</i>	<i>Director/a tesis</i>	<i>Fecha</i>
Bioquímica	Universidad Miguel Hernández de Elche	José Villalaín Boullón	5/2008

IDIOMAS (R = REGULAR, B = BIEN, C = CORRECTAMENTE)

<i>Idioma</i>	<i>Habla</i>	<i>Lee</i>	<i>Escribe</i>
Inglés	C	C	C
Alemán	R	R	R

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO DEL PROYECTO: Estructura de péptidos y moléculas lipofílicas de relevancia biológica en sistemas modelo de biomembranas.

ENTIDAD FINANCIADORA: DGESIC – PB98-0100

DURACIÓN DESDE:1999

HASTA: 2002

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. J. Villalaín

TÍTULO DEL PROYECTO: Interacción proteína-membrana en sistemas modelo de interés biológico. Caracterización estructural y funcional e interés farmacológico.

ENTIDAD FINANCIADORA: MCYT - BMC2002-00158

DURACIÓN DESDE:2003

HASTA: 2005

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. J. Villalaín

TÍTULO DEL PROYECTO: Targeting replication and integration of HIV (TRIoH)" (Thematic call in the area of 'Life sciences, genomics and biotechnology for health'), Integrated Project, FP6) ENTIDAD

FINANCIADORA: Comisión Europea

DURACIÓN DESDE:2004

HASTA: 2006

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. J. Villalaín

TÍTULO DEL PROYECTO: Inhibición de la entrada del virus HIV. Búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. FINANCIADORA: Proyecto B07I/2004, Consellería de Sanidad, Generalidad Valenciana

DURACIÓN DESDE:2004

HASTA: 2004

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. J. Villalaín

TÍTULO DEL PROYECTO: Ayuda Complementaria Al Proyecto Europeo: "Targeting Replication And Integration Of HIV". FINANCIADORA: MEC, Ref. SAF2004-0052-E

DURACIÓN DESDE:2005 HASTA: 2005

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. J. Villalaín

TÍTULO DEL PROYECTO: Ayuda Complementaria Al Proyecto Europeo: "Targeting Replication And Integration Of HIV". FINANCIADORA: GVA, Ref. ACOMP06/017

DURACIÓN DESDE:2006 HASTA: 2006

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. J. Villalaín

TÍTULO DEL PROYECTO: Caracterización estructural y funcional de la fusión de membrana mediada por virus. Búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. FINANCIADORA: BFU2005-00186/BMC, MEC

DURACIÓN DESDE:2006 HASTA: 2008

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. J. Villalaín

PUBLICACIONES

AUTORES/AS (p.o. de firma): Guillén J., Bernabeu A, Shapiro S and Villalaín J.
TÍTULO: Location and orientation of Triclosan in phospholipid model membranes.
REF. REVISTA/LIBRO: *Eur Biophys J.* **33(5)**, 448-453. *CLAVE: A*
FECHA PUBLICACIÓN ():* 2004
*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**):* índice de impacto 1.825

AUTORES/AS (p.o. de firma): Guillén J., Pérez-Berná A. J., Moreno M.R. and Villalaín J.
TÍTULO: Identification of the membrane-active regions of the severe acute respiratory coronavirus spike membrane glycoprotein using a 16/18-mer peptide scan: implications for the fusion mechanism.
REF. REVISTA/LIBRO: *Journal of Virology.* **79(3)**,1743-1752. *CLAVE: A*
FECHA PUBLICACIÓN ():* 2005
*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**):* índice de impacto 5.341

AUTORES/AS (p.o. de firma): Pérez-Berná A. J., Moreno M.R., Guillén J., Bernabeu A. and Villalaín J.
TÍTULO: The membrane-active regions of the Hepatitis C virus E1 and envelope glycoproteins.
REF. REVISTA/LIBRO: *Biochemistry.* **45(11)**, 3755-3768. *CLAVE: A*
FECHA PUBLICACIÓN ():* 2006
*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**):* índice de impacto 3.633

AUTORES/AS (p.o. de firma): Pérez-Fons L., Aranda F.J., Guillén J., Villalaín J. and Micol V.
TÍTULO: Rosemary (Rosmarinus officinalis) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes.
REF. REVISTA/LIBRO: *Arch Biochem Biophys.* **453(2)**, 224-236. *CLAVE: A*
FECHA PUBLICACIÓN ():* 2006
*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**):* índice de impacto 2.969

AUTORES/AS (p.o. de firma): Bernabeu A, Guillén J, Pérez-Berná AJ, Moreno MR, Villalaín J.
TÍTULO: Structure of the C-terminal domain of the pro-apoptotic protein Hrk and its interaction with model membranes.
REF. REVISTA/LIBRO: *Biochim Biophys Acta. Biomembranes.* **1768(6)**, 1659-1670. *CLAVE: A*
FECHA PUBLICACIÓN ():* 2007
*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**):* índice de impacto 3.587

AUTORES/AS (p.o. de firma): Guillén J, Moreno MR, Pérez-Berná AJ, Bernabeu A and Villalaín J.
TÍTULO: Interaction of a peptide from the pre-transmembrane domain of SARS-CoV spike protein with phospholipid membranes.
REF. REVISTA/LIBRO: *J Phys Chem B.* **111**, 13714-13725. *CLAVE: A*
FECHA PUBLICACIÓN ():* 2007
*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**):* índice de impacto 4.115

AUTORES/AS (p.o. de firma): Moreno MR, **Guillén J**, Pérez-Berná AJ, Amorós D, Gómez AI, Bernabeu A and Villalaín J.

TÍTULO: Characterization of the interaction of two peptides from the NHR domain of HIV gp41 with phospholipid membranes.

REF. REVISTA/LIBRO: *Biochemistry*. **46**, 10572-10584.

CLAVE: A

FECHA PUBLICACIÓN ()*: 2007

*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**)*: *índice de impacto* 3.633

AUTORES/AS (p.o. de firma): Pérez-Berná AJ, **Guillén J**, Moreno MR, Bernabeu A, Pabst G, Laggner P and Villalaín J.

TÍTULO: Identification of the membrane-active regions of HCV p7 protein. Biophysical characterization of the loop region.

REF. REVISTA/LIBRO: *J Biol Chem*. **283** (13), 8089-8101.

CLAVE: A

FECHA PUBLICACIÓN ()*: 2008

*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**)*: *índice de impacto* 5.808

AUTORES/AS (p.o. de firma): Moreno MR, Pérez-Berná AJ, **Guillén J** and Villalaín J.

TÍTULO: Biophysical characterization and membrane interaction of the most membranotropic region of the HIV-1 gp41 endodomain.

REF. REVISTA/LIBRO: *Biochim Biophys Acta. Biomembranes*. (In press).

CLAVE: A

FECHA PUBLICACIÓN ()*: 2008

*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**)*: *índice de impacto* 3.587

AUTORES/AS (p.o. de firma): Pérez-Berná AJ, **Guillén J**, Moreno MR, Gómez-Sánchez AI, Pabst G, Laggner P and Villalaín J.

TÍTULO: Interaction of the most membranotropic region of the HCV E2 envelope glycoprotein with membranes. Biophysical characterization.

REF. REVISTA/LIBRO: *Biophys J*. (In press).

CLAVE: A

FECHA PUBLICACIÓN ()*: 2008

*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**)*: *índice de impacto* 4.757

AUTORES/AS (p.o. de firma): **Guillén J**, de Almeida RFM, Prieto M and Villalaín J.

TÍTULO: Structural and dynamic characterization of the interaction of the putative fusion peptide of the S2 SARS-CoV virus protein with lipid membranes.

REF. REVISTA/LIBRO: *J Phys Chem B*. (Accepted manuscript)

CLAVE: A

FECHA PUBLICACIÓN ()*: 2008

*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**)*: *índice de impacto* 4.115

AUTORES/AS (p.o. de firma): Pérez-Berná AJ, Bernabeu A, Moreno MR, **Guillén J**, and Villalaín J.
TÍTULO: The pre-transmembrane region of the HCV E1 envelope glycoprotein. Interaction with model membranes.

REF. REVISTA/LIBRO: *Biochim Biophys Acta. Biomembranes*. (Accepted manuscript)

CLAVE: A

FECHA PUBLICACIÓN ()*: 2008

*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**)*: *índice de impacto* 3.587

AUTORES/AS (p.o. de firma): Pérez-Berná AJ, **Guillén J**, Moreno MR and Villalaín J.
TÍTULO: "Membrantropic regions of membrane-fusion proteins. The use of peptide libraries"
REF. REVISTA/LIBRO: Membrane-active peptides: methods and results on structure and function.
(Ed. M.R.C. Castanho), IUL La Jolla, California. *CLAVE:* CL
FECHA PUBLICACIÓN ():* to be published
*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**):*

AUTORES/AS (p.o. de firma): **Guillén J**, Pérez-Berná AJ, Moreno MR and Villalaín J.
TÍTULO: *The internal membrane-active peptide from SARS-CoV S2 glycoprotein. Biophysical characterization and membrane interaction.*
REF. REVISTA/LIBRO: *Virology.* *CLAVE:* A
FECHA PUBLICACIÓN ():* submitted manuscript
*ASPECTOS MÁS RELEVANTES (**):* *índice de impacto 3.525*



ESTANCIAS EN CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Centro de Química-Física Molecular, Instituto Superior Técnico de Lisboa (Portugal).

Supervisores: Prof. Manuel Prieto y Dr. Rodrigo F.M. Almeida.

"Fluorescencia resuelta en el tiempo de interacción péptido-membrana"

Noviembre 2006. Acción integrada Hispano-Portuguesa.

Biophysics and Biomembrane Group, Medical Biochemistry, Institute of Biomedicine, Helsinki (Finlandia).

Supervisores: Prof. Paavo Kinnunen y Dra. Karen Sabatini.

"Estudios de péptidos en monocapas y interacción antiviral-membrana. Inserción e isothermas de compresión de monocapas"

Mayo-Julio 2007. FEBS-short term fellowship.



CONGRESOS

AUTORES/AS: Bernabeu A., Pérez-Berná A.J., **Guillén J.** y Villalaín J.
TÍTULO: "Interaction of the trans-membrane fragment of Bik with model membranes"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: IV European Biophysics Congress
ORGANIZADO POR: European Biophysical Societies Association
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alicante (Spain)
AÑO: 2003

AUTORES/AS: **Guillén J.**, Moreno MR y Villalaín J.
TÍTULO: "Interaction of Noscomin with model membranes"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: IV European Biophysics Congress
ORGANIZADO POR: European Biophysical Societies Association
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alicante (Spain)
AÑO: 2003

AUTORES/AS: Pérez-Berná A.J., **Guillén-Casas J.**, Giudici A.M. y Villalaín J.
TÍTULO: "Interaction of Viscotoxin A₃ on model biomembrane systems by NMR"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: I International Conference, Biology after genome: a physical view
ORGANIZADO POR: Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos.
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Zaragoza (Spain)
AÑO: 2004

AUTORES/AS: Pérez Fons L., Garzón M.T., **Guillén J.**, Villalaín J. y Micol V.
TÍTULO: "Efecto de compuestos antioxidantes procedentes de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre las propiedades físicas de membranas modelo"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: XXVII Congreso de la SEBBM
ORGANIZADO POR: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Lérida (Spain)
AÑO: 2004

AUTORES/AS: Pérez-Berná A. J., Moreno M. R, **Guillén-Casas J.** y Villalaín J.
TÍTULO: "Interacción con membranas modelo de péptidos procedentes de las proteínas E1 y E2 del virus de la Hepatitis C"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: XXVII Congreso de la SEBBM
ORGANIZADO POR: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Lérida (Spain)
AÑO: 2004

AUTORES/AS: **Guillén-Casas J.**, Bernabeu A., Pérez-Berná A.J., Shapiro S y Villalain J.
TÍTULO: "Localización y orientación de la molécula de triclosan en membranas modelo"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel

CONGRESO: XXVII Congreso de la SEBBM
PUBLICACIÓN: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Lérida (Spain)
AÑO: 2004

AUTORES/AS: Moreno, M.R., **Guillén, J.**, Pérez-Berná, A.J. y Villalaín J.
TÍTULO: "GP41 and membrana fusion. Looking for targets and inhibitors of HIV fusion"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: Targeting Replication and Integration of HIV TRloH General Assembly
ORGANIZADO POR: Comisión Europea, Instituto de investigación "George Speyer Haus"
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Frankfurt (Germany)
AÑO: 2005

AUTORES/AS: Pérez-Berná A.J., Moreno M, **Guillén J.** y Villalaín J.
TÍTULO: "Identification of the membrane-active regions of the HCV and E2 proteins"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: VI European Symposium of The Protein Society
ORGANIZADO POR: Protein Society
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Barcelona (Spain)
AÑO: 2005

AUTORES/AS: Pérez-Berná A.J. **Guillén J.**, Moreno MR, y Villalaín J.
TÍTULO: "Biophysical characterization of a peptide derived from the pre-transmembrane domain of HCV E1 glycoprotein"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: Workshop on Lipid-Protein Interactions
ORGANIZADO POR: COST Action D-22
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Murcia (Spain)
AÑO: 2006

AUTORES/AS: Moreno MR, **Guillén J.**, Pérez-Berná A.J., O'Shea P and Villalaín J.
TÍTULO: "Interaction of a peptide derived from the post-fusion region of gp41 Env ectodomain with biomembrane model systems"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: Workshop on Lipid-Protein Interactions
ORGANIZADO POR: COST Action D-22
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Murcia (Spain)
AÑO: 2006

AUTORES/AS: **Guillén J.**, Moreno MR, Pérez-Berná A.J. and Villalaín J.
TÍTULO: "Interaction of the pretransmembrane domain of SARS-CoV with phospholipid model membranes"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: Workshop on Lipid-Protein Interactions

ORGANIZADO POR: COST Action D-22
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Murcia (Spain)
AÑO: 2006

AUTORES/AS: Moreno M. R , Gómez A.I., **Guillén J.**, Pérez-Berná A. J., Bernabeu A., and Villalaín J.

TÍTULO: "Interacción de péptidos derivados de la región Post-FP del ectodominio de gp41 con sistemas modelo de membrana"

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel

CONGRESO: XXIX Congreso de la SEBBM

ORGANIZADO POR: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alicante (Spain)

AÑO: 2006

AUTORES/AS: Pérez-Berná A. J., **Guillén J.**, Bernabeu A., Moreno M. R, and Villalaín J.

TÍTULO: "Interacción de un péptido derivado del dominio de fusión de la proteína E1 de HCV con sistemas modelo de membrana"

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel

CONGRESO: XXIX Congreso de la SEBBM

ORGANIZADO POR: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alicante (Spain)

AÑO: 2006

AUTORES/AS: Pérez-Fons L., **Guillén J.**, Aranda F.J., Villalaín J. and Micol V.

TÍTULO: "Actividad antioxidante de extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y su efecto sobre las propiedades físicas de membranas modelo"

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel

CONGRESO: XXIX Congreso de la SEBBM

ORGANIZADO POR: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alicante (Spain)

AÑO: 2006

AUTORES/AS: **Guillén J.**, Pérez-Berná A. J., Moreno M. R , Bernabeu A., and Villalaín J.

TÍTULO: "Interacción del dominio pre-transmembrana de SARS-CoV. Implicaciones para el mecanismo de fusión viral"

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel

CONGRESO: XXIX Congreso de la SEBBM

ORGANIZADO POR: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alicante (Spain)

AÑO: 2006

AUTORES/AS: Villalaín J, Moreno M. R., **Guillén J.**, Pérez-Berná A. J.

TÍTULO: "Identification of the membrane-active regions of HCV E1 and E2 envelope glycoproteins. Interaction with model membranes"

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses (Molecular Virology and Pathogenesis)
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Cairns (Australia)
AÑO: 2006

AUTORES/AS: Moreno M.R., Gómez-Sánchez A.I., Pérez-Berná A.J., **Guillén J.**, Bernabeu A., Prieto M.J.E. and Villalaín J.
TÍTULO: "Putative post-TM region in the long cytoplasmatic tail of gp41. Interaction of a peptide derived from the LLP2-LLP3 region of gp41 Env endodomain with biomembrane model systems"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: VI Ibero American Congress of Biophysics
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Madrid (Spain)
AÑO: 2006

AUTORES/AS: Pérez-Berná A. J., Moreno M. R, **Guillén J.**, Amorós D., Bernabeu A., and Villalaín J.
TÍTULO: "Biophysical characterization of a peptide derived from the HCV E2 envelope glycoprotein"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: VI Ibero American Congress of Biophysics
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Madrid (Spain)
AÑO: 2006

AUTORES/AS: Moreno, M.R., Gómez-Sánchez, A.I., Mas, V., Pérez-Berná, A.J., **Guillén, J.**, Amorós, D., Estepa A. and Villalaín J.
TÍTULO: "Searching peptide entry inhibitors targeting HIV GP41"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: Targeting Replication and Integration of HIV TR10H meeting
ORGANIZADO POR: Comisión Europea, Facultad de Química, Universidad de Barcelona
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Barcelona (Spain)
AÑO: 2006

AUTORES/AS: Moreno M. R, Gómez A.I., **Guillén J.**, Pérez-Berná A. J., Bernabeu A., Amorós D., and Villalaín J.
TÍTULO: "Biophysical study of two peptides pertaining to the first part of the NHR segment of gp41 Env ectodomain of HIV-1 with biomembrane model systems"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel
CONGRESO: 2nd Workshop on biophysics of membrane-active peptides.
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Lisbon (Portugal)
AÑO: 2007

AUTORES/AS: **Guillén J.**, Pérez-Berná A. J., Moreno M. R, Bernabeu A., Gómez A.I., Amorós D., Almeida R.F. Prieto M. and Villalaín J.

TÍTULO: "Characterization of the putative fusion peptide in the S2 SARS-CoV virus protein".

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel

CONGRESO: 2nd Workshop on biophysics of membrane-active peptides.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Lisbon (Portugal)

AÑO: 2007

AUTORES/AS: Pérez-Berná A. J., Moreno M. R, **Guillén J.**, Bernabeu A., Gómez A.I., Amorós D., and Villalaín J.

TÍTULO: "Biophysical characterization of the fusogenic regions of E1 and E2 envelope glycoproteins from HCV: Interaction with model membranes".

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel

CONGRESO: 2nd Workshop on biophysics of membrane-active peptides.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Lisbon (Portugal)

AÑO: 2007

AUTORES/AS: Villalaín J., Moreno M. R, **Guillén J.**, , and Pérez-Berná A. J.

TÍTULO: "Membrane-active peptides from membrane-fusion proteins".

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Charla invitada

CONGRESO: 2nd Workshop on biophysics of membrane-active peptides.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Lisbon (Portugal)

AÑO: 2007

AUTORES/AS: Villalaín J., Moreno M. R, Gómez A.I., **Guillén J.**, and Pérez-Berná A. J.

TÍTULO: "Inhibition of gp41-mediated membrane fusion".

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Charla invitada.

CONGRESO: Replication and Integration of HIV Fourth General Assembly and Open Symposium

ORGANIZADO POR: *Comisión Europea* in collaboration with the Belgian Society of Biochemistry and Molecular Biology.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Leuven (Belgium)

AÑO: 2007

AUTORES/AS: **Guillén-Casas J.**, Pérez-Berná A. J., Moreno-Raja M. R., Amorós D., Gómez A.I., and Villalaín J.

TÍTULO: "Glicoproteína S del coronavirus del SARS. Zonas implicadas en la fusión de membranas".

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Charla invitada

CONGRESO: XXIX Congreso de la SEBBM

ORGANIZADO POR: Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Málaga (España)

AÑO: 2007

AUTORES/AS: Pérez-Berná A. J., **Guillén J.**, Moreno M. R., Gómez A.I., Amorós D., and Villalaín J.

TÍTULO: "Fusogenic regions of the HCV E1 and E2 Env glycoproteins. Interaction with model membranes".

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel.
CONGRESO: 48th International Conference on the Bioscience of Lipids
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Turku (Finlandia)
AÑO: 2007

AUTORES/AS: **Guillén J.**, de Almeida R.F.M., Prieto M.J.E., and Villalaín J.
TÍTULO: "Characterization of the putative fusion peptide of the SARS coronavirus S2 glycoprotein."
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel.
CONGRESO: 52nd Annual Meeting Biophysical Society
ORGANIZADO POR: *Biophysical Society*
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Long Beach (USA)
AÑO: 2008

AUTORES/AS: **Guillén J.**, Pérez-Berná A. J., Gómez A.I., Moreno M. R., González-Alvárez A., and Villalaín J.
TÍTULO: "Interaction of the pretransmembrane domain of SARS-CoV. Implications for the viral fusion mechanism"
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel.
CONGRESO: 52nd Annual Meeting Biophysical Society
ORGANIZADO POR: *Biophysical Society*
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Long Beach (USA)
AÑO: 2008

AUTORES/AS: Pérez-Berná A. J., **Guillén J.**, Gómez A.I., Moreno M. R., González-Alvárez A., Pabst G., Laggner P., and Villalaín J.
TÍTULO: "Hepatitis C Virus E1 and E2 Envelope Glycoproteins. Structural and Biophysical Characterization of the Fusogenic Region".
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de un cartel.
CONGRESO: 52nd Annual Meeting Biophysical Society
ORGANIZADO POR: *Biophysical Society*
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Long Beach (USA)
AÑO: 2008

AUTORES/AS: Pérez-Berná A. J., **Guillén J.**, Gómez A.I., Moreno M. R., González-Alvárez A., Pabst G., Laggner P., and Villalaín J.
TÍTULO: "The membrane-active regions of HCV p7 protein. Biophysical characterization of the loop region".
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Charla invitada
CONGRESO: XI Encuentro Peptídico Ibérico.
LUGAR DE CELEBRACIÓN: *Santiago de Compostela (España)*
AÑO: 2008

OTROS MÉRITOS O ACLARACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR
(utilice únicamente el espacio de una página DIN A4)

CURSOS

2004 Barcelona

Workshop of Nuclear Magnetic Resonance on Paramagnetic and Diamagnetic Systems.
Molecular Interactions

2006 Alicante

III BIANUAL RMN Conferencia grupo español (RSEQ)
Miembro del comité organizador

BECAS DISFRUTADAS

Beca Predoctoral, Proyecto europeo Abril 2004-Diciembre 2005

Beca FPTAI, Generalitat Valenciana. 2006-2007

FEBS Short-term fellowship Mayo-Julio 2007

OTROS DATOS DE INTERÉS

Socio de la Sociedad Española Bioquímica y Biología Molecular (desde 2004).
Socio adherido de la Sociedad de Biofísica de España (desde 2007).

GRANDES EQUIPOS QUE UTILIZA O HA UTILIZADO

CLAVE : R= responsable, UA = usuario asiduo, UO = usuario ocasional

<i>EQUIPO: Espectrómetro de Infrarrojo</i>	<i>FECHA:2002-2008</i>	<i>CLAVE: UA</i>
<i>EQUIPO: Espectrofluorímetro</i>	<i>FECHA:2002-2008</i>	<i>CLAVE: UA</i>
<i>EQUIPO: Calorímetros de barrido</i>	<i>FECHA:2002-2008</i>	<i>CLAVE: UO</i>
<i>EQUIPO: Dicroísmo circular</i>	<i>FECHA:2004-2008</i>	<i>CLAVE: UA</i>
<i>EQUIPO: Resonancia magnética nuclear (MAS-NMR y disolución)</i>	<i>FECHA:2003-2008</i>	<i>CLAVE: UO</i>
<i>EQUIPO: Aparato de medidas en monocapas Kibron Inc</i>	<i>FECHA:2007</i>	<i>CLAVE: UO</i>
<i>EQUIPO: Láser tiempos de vida</i>	<i>FECHA:2007</i>	<i>CLAVE: UO</i>