

**Relaciones estructurales y funcionales en
eucariotas, del dominio *VSR-specific domain* de
la familia de receptores vacuolares vegetales
VSR**

MAVI JOHANNA BLANCO DÍAZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA
2010**

**Relaciones estructurales y funcionales en
eucariotas, del dominio *VSR-specific domain* de
la familia de receptores vacuolares vegetales
VSR**

MAVI JOHANNA BLANCO DÍAZ

Código: 2010409

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

Director:

Ph.D JORGE HERNANDEZ TORRES

Universidad industrial de Santander

Bucaramanga, Colombia

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

BUCARAMANGA

2010

A Dios, mi padre celestial que me ha dado el ser, me ha permitido ver Su luz en mi oscuridad, Su esperanza en mi abatimiento, Su fortaleza en mi temor y Su sabiduría en mi ignorancia.

A mi madre, a su amor, esmero y generosidad.

A Luz, Mónica y Rocío del Pilar Blanco Díaz, a su cariño sincero.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander, porque siempre será un honor pertenecer o haber sido parte de ella, por ser el lugar donde crecí como persona y como profesional.

A mi familia, a mi madre, a mi padre, a mis hermanas Luz, Mónica, Diana y Mariela, por todo su amor, confianza y paciencia. Por ser mí apoyo todos los días.

A mis sobrinas y sobrinos, por ser la alegría de mi vida.

Al doctor Jorge Hernández T. por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por su contribuciones y su confianza.

A María Fernanda Silva Lara, por su sincera, única y generosa amistad.

A la familia Silva Lara, por convertirse en mi segunda familia durante toda la carrera.

A mis compañeras y amigas Licet Durán, Martha Barrera, Diana carolina Parra, Merly Carrillo, Laura Marcela Gómez, Melisa Barrios, Erika Acosta, Nedy Ramírez, y Angélica Cogollo, por acompañarme en cada paso y ayudarme a levantar en cada caída y todos los momentos felices que me han regalado.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	15
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 <i>SORTING</i> VACUOLAR EN PLANTAS	19
2.1.1 SEÑALES PARA EL <i>SORTING</i> VACUOLAR	20
2.1.2 BP-80	21
2.2 <i>SORTING</i> DE PROTEÍNAS HACIA LOS LISOSOMAS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS. FAMILIA VPS10P-D	26
2.3 <i>SORTING</i> DE PROTEÍNAS EN LEVADURAS	30
2.4 LA VÍA SECRETORA Y LA VÍA ENDOCÍTICA	31
2.5 LA VACUOLA	33
2.5.1 TIPOS DE COMPARTIMENTOS VACUOLARES	34
2.6 EL LISOSOMA	36
2.7 CLATRINA	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GENERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. METODOLOGÍA	41
5. RESULTADOS	43
5.1 PRESENCIA DEL <i>VSR SPECIFIC DOMAIN</i> EN EL LINAJE VIRIDIPLANTAE	43
5.2 DOMINIO CENTRAL DE BP-80 CONSERVADO EN PROTISTAS	46
5.3 <i>VSR SPECIFIC DOMAIN</i> EN BACTERIAS	46
5.4 SIMILARIDAD ENTRE EL <i>VSR SPECIFIC DOMAIN</i> Y LOS RECEPTORES LDL	47
5.5 RELACIONES ESTRUCTURALES ENTRE EL <i>VSR SPECIFIC DOMAIN</i> Y LOS DOMINIOS VPS10P	48
5.6 ANÁLISIS DE AGREGADOS HIDROFÓBICOS ENTRE <i>VSR SPECIFIC DOMAIN</i> Y LOS DOMINIOS VPS10P DE LA LEVADURA	50
5.7 HCA SCORE	50
6. DISCUSIÓN	52
6.1 RELACIÓN DEL <i>VSR SPECIFIC DOMAIN</i> Y B-PROPELLER	53
6.2 RELACIONES ESTRUCTURALES, FUNCIONALES Y EVOLUTIVAS DEL <i>VSR SPECIFIC DOMAIN</i>	54
7. CONCLUSIONES	56
8. BIBLIOGRAFÍA	57
9. ANEXOS	70

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Secuencias proteicas de angiospermas y gimnospermas que comparten mayor identidad con el <i>VSR specific domain</i>	43
Tabla 2. HCA score para los alineamientos HCA que obtuvieron identidades menores al 40%.	51

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Fig. 1: Modelo del tráfico mediado por receptores en la vía secretora vegetal.	17
Fig. 2: Modelo estructural de la región N-terminal BP-80.	22
Fig. 3: Evolución de los VSRs vegetales en viridiplantae y cromalveolados.	23
Fig. 4: <i>Sorting</i> de proteínas lisosomales hacia los lisosomas en mamíferos.	25
Fig.5: Descripción estructural de los miembros de la familia Vps10p.	28
Fig. 6: siete trayectos básicos recorridos para la biogénesis, mantenimiento y abastecimiento de las vacuolas.	29
Fig. 7: Representación gráfica del triskelión: las cadenas pesadas están representadas en azul y las cadenas livianas en amarillo.	32
Fig. 8: organización de las vesículas cubiertas de clatrina: aquí se representan la posición de los receptores transmembranales, que intervienen en la internalización de las proteínas, así como los complejos adaptadores.	37
Fig.9: papel de las CCVs en la endocitosis mediada por receptores.	38
Fig. 10: Organización estructural del receptor para el <i>sorting</i> vacuolar BP-80. Diagrama elaborado a partir de la información suministrada en Uniprot.	39
Fig. 11 presencia del <i>VSR specific domain</i> en briofitos y algas verdes.	45

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Fig.12: HCA entre una secuencia proteica proveniente de <i>Pheodactylum tricornum</i> y el VSR specific domain (<i>pisum sativum</i>).	70
Fig.13: Alineamiento HCA entre el VSR specific domain de la BP 80 (<i>Pisum sativum</i>) y la secuencia XP 002294134 (<i>Thalassiusira pseudonana</i>).	71
Fig.14: a. HCA entre proteina externa de membrana de la Alfa proteobacteria HTCC12255 y el VSR specific domain. b. alineamiento entre un segmento de la proteina bacteriana y otro del VSR specific domain.	72
Fig.15: alineamiento HCA entre el VSR specific domain y una secuencia proteica de la proteobacteria <i>Plesiocystis pacifera</i> .	73
Fig.16: Analisis de clusters hidrofobicos entre: a. la secuencia del VSR especific domain y el receptor LDL presente en <i>Cricetulus griseus</i> (AAA51449). b. la secuencia del VSR especific domain y el receptor de lipoproteínas (<i>Leucophaea madera</i>) (BAE00010).	74
Fig.17: Análisis de agregados hidrofóbicos entre el Vsr specific domain (<i>Pisum sativum</i>) y la secuencia del dominio Vps10p (a.a. 275-545) de sortilina (<i>Homo sapiens sapiens</i>) (CAA66904).	75
Fig.18: Análisis de agregados hidrofóbicos, entre la región β -propeller del receptor LDL presente en <i>Cricetulus griseus</i> (AAA51449) y el dominio Vps10p de la sortilina.	76
Fig.19: Alineamiento HCA entre el dominio Vps10p de la sortilina y la proteina ZP_01448706 de <i>Alpha proteobacterium</i> HTCC2255.	77
Fig.20: Alineamiento HCA entre el primer dominio Vps10p (a.a 45-728) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y el VSR sepcific domain (<i>Pisum sativum</i>).	78
Fig.21: Alineamiento HCA entre el segundo dominio Vps10p (a.a 752-1383) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y el VSR sepcific domain (<i>Pisum sativum</i>).	79

RESUMEN

TITULO

RELACIONES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES EN EUCARIOTAS, DEL DOMINIO *VSR-SPECIFIC DOMAIN* DE LA FAMILIA DE RECEPTORES VACUOLARES VEGETALES *VSR**.

AUTOR

MAVI JOHANNA BLANCO DÍAZ**

PALABRAS CLAVE

SORTING, BP-80, *VSR*, *B-PROPELLERS*, *VPS10P-D*

DESCRIPCIÓN

El *sorting* de proteínas se entiende como el proceso de selección y direccionamiento de proteínas a un determinado destino, ya sea hacia los lisosomas, las vacuolas, o la membrana celular.

La BP-80 es la proteína arquetipo de la familia de receptores para el *sorting* vacuolar en plantas. Esta proteína presenta en su región N-terminal: un péptido señal, un dominio PA (asociado a proteasas) y un dominio central "*VSR specific domain*". Hacia su extremo C-terminal presenta: tres repeticiones tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico), un dominio transmembranal y por ultimo una corta cola citoplasmática. Homólogos de este tipo de receptor se han encontrado en angiospermas, gimnospermas, briofitos y algas verdes.

En los *VSRs* vegetales (BP-80) se ha propuesto, un sitio específico de unión a ligandos establecido entre el dominio PA y el dominio central; mientras que, el sitio no específico de unión a ligandos se hallaría entre el dominio central y las repeticiones EGF, pero la estructura y función del dominio central "*VSR specific domain*" no han sido esclarecidas.

En el presente estudio se realizó el análisis de *clusters* hidrofóbicos con el fin de obtener información acerca de la estructura y función del *VSR specific domain*. Según los resultados obtenidos se propone: **a.** La conservación del *VSR specific domain* en el linaje viridiplantae. **b.** El posible origen procariota del *VSR specific domain*. **c.** Que la estructura del *VSR specific domain* esta posiblemente constituida por β -*propellers*. **d.** Clasificar al *VSR specific domain* como un posible dominio *Vps10p* vegetal. **e.** Que la región comprendida entre el a.a. 160 al 305 en el *VSR specific domain*, podría ser un sitio importante de unión a ligandos **f.** Los *VSRs* vegetales como posibles ortólogos de la familia *Vps10p-D* en mamíferos y levaduras.

* Trabajo de grado.

** Facultad de ciencias básicas. Escuela de Biología. Director: Jorge Hernández torres.

SUMMARY

TITLE

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL RELATIONSHIPS IN EUKARYOTES OF VSR DOMAIN-SPECIFIC DOMAIN FROM PLANT VACUOLAR RECEPTOR FAMILY VSR*.

AUTHOR

MAVI JOHANNA BLANCO DÍAZ**

KEY WORDS

SORTING, BP-80, VSR, *B-PROPELLERS*, VPS10P-D.

The sorting of proteins is defined as the selection and routing protein process to a destination, either to the lysosomes, vacuoles, or cell membrane.

The BP-80 is the archetypal protein from a receptors family for vacuolar sorting in plants. This protein presents at its N-terminal region: a signal peptide, a PA domain (protease associated) and a central "VSR- specific domain." Toward its C-terminal dispaly: three EGF-like repetitions (epidermal growth factor), a transmembrane domain and finally a short cytoplasmic tail. Homologues of this kind of receptor have been found in angiosperms, gymnosperms, bryophytes and green algae.

In the plant VSRs (BP-80) has been proposed a site-specific ligand binding domain, established between the PA and the central domain, whereas, the ligand binding specific site domain would be found between the central and repetitions EGF, but the structure and function of the central domain "VSR- specific domain " have not been clarified.

In the present study was performed hydrophobic cluster analysis in order to obtain information about the structure and function of VSR- specific domain. According to the results is proposed: **a.** The conservation of VSR- specific domain in the Viridiplantae lineage. **b.** The possible prokaryotic origin of VSR-specific domain. **c.** The structure of VSR-specific domain is proposed to adopt a β -propeller fold. **d.** Classify VSR- specific domain as a potential Vps10p-like domain in plants. **e.** That the region between the a.a. 160 to 305 in the VSR- specific domain, could be a major site of ligand binding **f.** The plant VSRs as potential orthologues of Vps10p-D family in mammals and yeast.

* Work Degree

** Faculty of Human Sciences. School of biology. Directress: Jorge Hernández Torres.

Abreviaturas

a.a.: aminoácido.

AP: *adaptor protein complex* (Complejo adaptador de proteínas).

BP-80: *binding protein of 80 KDa* (Proteína de unión de 80 KDa).

CCVs: *clathrin coated vesicles* (Vesículas cubiertas de clatrina).

CCPs: *clathrin coated pits* (Concavidades cubiertas de clatrina).

CTPP: *C-terminal propeptide* (Propéptido ubicado en la región carboxilo de la proteína).

CT: *cytosolic tail* (Cola citoplasmática).

DIP: *dark induced protein* (Proteína inducida por la oscuridad).

DV: *dense vesicle* (Vesícula densa).

EGF: *epidermal growth factor* (Factor de crecimiento epidermal)

ER: *endoplasmic reticulum* (Retículo endoplasmático).

GA: *Golgi apparatus* (Aparato de Golgi).

GGAs: *Golgi-localized γ -adaptin ear homology domain ARF binding protein*

LV: *lytic vacuole* (Vacuola lítica).

MPR: *mannose 6-phosphate receptor* (Receptor de manosa 6 fosfato).

MVBs: *multivesicular bodies* (Cuerpos multivesiculares).

NGF: *nerve growth factor* (factor del crecimiento nervioso).

NTPP: *N-terminal propeptide* (Propéptido ubicado en la región amino de la proteína).

PM: *plasma membrane* (Membrana plasmática).

PSV: *protein storage vacuole* (Vacuola para el almacenamiento de proteínas).

PVC: *prevacuolar compartment* (Compartimento prevacuolar).

SorCS: *sortilin-related receptor CNS expressed* (Receptor expresado en el sistema nervioso central relacionado con el *sorting* de proteínas).

SORLA: *sorting protein-related receptor with A-type repeats* (Receptor relacionado al *sorting* de proteínas con repeticiones tipo A).

ss-VSD: *sequence-specific vacuolar sorting determinant* (Determinantes con secuencia específica para el *sorting* vacuolar).

TGN: *tran Golgi network* (Red *trans* del aparato de Golgi).

TIP: *tonoplast intrinsic protein* (Proteína intrínseca del tonoplasto).

TMD: *transmembrane domain* (Dominio transmembranal).

VPS10P-D: *vacuolar protein sorting 10 protein – domain* (dominio, presente en proteína 10 para sorting vacuolar).

VSDs: *vacuolar sorting determinants* (Determinantes para el *sorting* vacuolar).

VSV: *vegetative storage vacuole* (Vacuola vegetativa de almacenamiento).

VSR: *vacuolar sorting receptor* (Receptor para el *sorting* vacuolar).

INTRODUCCIÓN

Las vacuolas son compartimentos que ocupan el 80% de una célula madura, manteniendo la turgencia de la célula y sirven como depósito de aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y sales minerales. Contienen enzimas hidrolíticas y pueden servir como almacén de proteínas de reserva (Boller & Wiemken, 1987). En las plantas, se han estudiado dos tipos de vacuolas en particular: las vacuolas de almacenamiento de proteínas (PSV) y las vacuolas líticas (LV) (Swanson *et al.*, 1998; Jauh *et al.*, 1999). Las PSVs almacenan proteínas intracelulares que suministran los nutrientes durante el desarrollo y la maduración celular (Paris *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2001). Las LVs contienen enzimas hidrolíticas que trabajan en un ambiente ácido, degradando proteínas (Paris *et al.*, 1996).

La acumulación de proteínas hidrolíticas es usada como evidencia, para considerar la vacuola como un orgánulo análogo al lisosoma en las células de mamíferos (Matile, 1975). Al igual que el sistema lisosomal en mamíferos, las proteínas vacuolares son sintetizadas en el retículo endoplasmático, maduran en el aparato de Golgi y son transportadas hacia la vacuola (Harley *et al.*, 1989; Robinson *et al.*, 1989).

Las proteínas solubles destinadas a la vacuola contienen determinantes para el *sorting** vacuolar (VSDs) los cuales son reconocidos por una familia de proteínas denominada VSR (receptores para el *sorting* vacuolar) (Vitale & Raikhel, 1999; Jiang & Rogers, 2003).

La familia de receptores vacuolares VSR se encarga del *sorting* de proteínas, desde el aparato de Golgi hacia las vacuolas en las células vegetales; estos receptores se localizan dentro de las vesículas cubiertas de clatrina (CCVs) (Hinz *et al.*, 1999). Los receptores VSR reconocen secuencias específicas

* *Sorting*: término inglés usado en biología para referirse al proceso de selección y direccionamiento de proteínas.

(VDSs), generalmente de clase NPRI (Asn-Asn-Pro-Ile-Arg) (Matsuoka & Neuhaus, 1999), en las proteínas que transportan hacia las vacuolas líticas (Paris & Neuhaus, 2002).

BP 80 (VSR_{ps-1}), fue la primera VSR aislada de *Pisum sativum* y es considerada proteína arquetipo de los VSRs. BP 80 reconoce los VSDs en el extremo N-terminal de la proaleurina (Kirsch *et al.* 1994), a la cual transporta desde el aparato de Golgi a las LVs (Humair *et al.*, 2001; Paris & Neuhaus, 2002).

BP 80 puede reconocer VSDs tanto en el extremo N-terminal, como en el extremo C-terminal, así como VSDs localizados en la parte interna de ciertas proteínas, como 2S albúmina y ricina respectivamente (Cao *et al.*, 2000).

Los miembros de la familia VSR presentan la siguiente conformación general: un dominio transmembranal simple (TMD) y una cola citoplasmática (CT). La porción N-terminal de la BP-80 contiene tres regiones funcionales mayores: una región homóloga al dominio interno de la proteína ReMemBR-H2 (RMR), una región única central (*VSR specific domain*) cuya función es desconocida y tres repeticiones EGF (factores de crecimiento epidérmico) en la región C-terminal. Se propuso que el dominio RMR es responsable de la interacción directa con el motivo NPIR en la proaleurina en el TGN para la interacción proteína-receptor (Cao *et al.* 2000). La cola citoplasmática de BP-80 contiene un motivo basado en Tirosina (YMPL); éste es reconocido por el complejo adaptador AP-1 en las CCVs que surgen del aparato de Golgi (Ahmed *et al.*, 1997; Paris *et al.*, 1997; Shimada *et al.*, 1997; Sanderfoot *et al.*, 1998) (Fig.1).

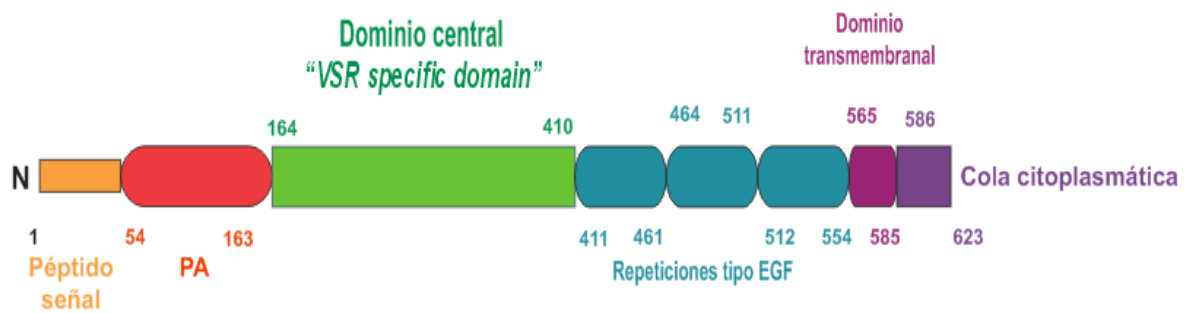


Fig. 1 Organización estructural del receptor para el *sorting* vacuolar BP-80. Diagrama elaborado a partir de la información suministrada en Uniprot (www.uniprot.org/uniprot/P93484).

En *Arabidopsis thaliana* se conocen siete isoformas de BP 80 (AtVSR1-7/AtELP1-7). AtELP1 ha sido localizada principalmente en la membrana plasmática y posiblemente interviene en el transporte de proteasas, la Globulina 12S y la Albúmina 2S en *A. thaliana* (Ahmed *et al.* 2000; Shimada *et al.* 2003; Otegui *et al.* 2006). Se han encontrado las otras seis AtELPs en distintos tejidos (hojas, raíces y troncos) en plantas expuestas a estrés hídrico; sin embargo, su localización y su función no están bien esclarecidas (Laval *et al.*, 1999).

Se identificó una nueva familia de posibles receptores, llamada ReMemBR-H2 (*Receptor Membrane Ring-H2*) o familia RMR (Cao *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2000). Estas proteínas se componen de un dominio PA situado en el extremo amino, carecen de repeticiones EGF, pero sí presentan un dominio transmembranal, una cola citoplasmática, además un dominio RING-H2 y una región rica en serina (Jiang *et al.*, 2000). En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentran 6 homólogos AtRMR1-6. AtRMR1 funciona como receptor de proteínas destinadas a la PSV; interactúa con el CTPP de la faseolina a un pH ácido, cuando el complejo AtRMR1-faseolina llega a la PSV. Al encontrarse en un medio neutro, dicho complejo se disocia (Park *et al.*, 2005).

Se ha propuesto un ancestro viridiplantae para los VSRs vegetales (Becker & Hoef-Emden, 2009) y su relación ortóloga son respecto a las β -integrinas humanas (Laval *et al.*, 1999).

En el presente trabajo, por medio del análisis de agregados hidrofóbicos HCA, se analizó la estructura y función del dominio central de la BP-80 “*VSR specific domain*” región que compromete 248 de los 623 a.a. que componen dicha proteína. Ya que la estructura y función del *VSR-specific domain* no se han esclarecido, la realización de un estudio a nivel 2D mediante HCA, podría arrojar importante información acerca del *VSR-specific domain*, considerando que esto no ha sido posible mediante otros métodos bioinformáticos basados en la estructura primaria.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. SORTING VACUOLAR EN PLANTAS

Las proteínas solubles alcanzan la vacuola debido a que contienen determinantes para el *sorting* vacuolar (VSDs), los cuales son reconocidos por una familia de proteínas llamada receptores para el *sorting* vacuolar (VSRs) (Vitale & Raikhel, 1999; Jiang & Rogers, 2003).

Las proteínas destinadas a la vacuola (proteínas solubles), que contienen el péptido señal, entran a la vía secretora desde el retículo endoplasmático (ER), donde los chaperones ER (ej. claxina, calreticulina y BIP) facilitan el plegamiento de las proteínas. Antes de su correcto involucramiento, las proteínas son exportadas desde el ER, por medio de vesículas hacia la red *cis* del aparato de Golgi. Dependiendo de la información de *targeting** impresa dentro de su cadena polipeptídica, estas proteínas, pasan desde la red *cis* a la red *trans* del aparato de Golgi y son transportadas hacia múltiples destinos intracelulares (Jiang & Rogers, 2003).

Los receptores encargados del *sorting* de proteínas, desde el aparato de Golgi hacia la vacuola, están presentes en la red *trans* del aparato de Golgi. Allí se unen a su proteína cargo, acoplándose posteriormente a vesículas cubiertas de clatrina (CCVs) (Jiang & Rogers, 2003), por medio de complejos adaptadores de proteínas (AP) (Hinz *et al.*, 1999). Las CCVs viajan hasta los compartimentos prevacuolares (PVC) o cuerpos multivesiculares (MVB) (Jiang & Rogers, 2003). Los PVC reciben las proteínas y posteriormente las liberan en la vacuola por fusión con el tonoplasto. El reciclado de VSRs desde los compartimentos prevacuolares es mediado por un complejo retrómero (Lam *et al.*, 2005; Oliviusson *et al.*, 2006) (Fig. 2).

* *Targeting*: se refiere al proceso de reconocimiento de proteínas para ser transportadas posteriormente.

Las regiones N-terminal y C-terminal de las proteínas solubles son importantes para su transporte hacia las vacuolas, ya que estos sitios presentan las secuencias determinantes específicas, para que las proteínas sean reconocidas por los receptores; también hay secuencias internas que ayudan en el reconocimiento, selección y transporte de las proteínas.

2.1.1 SEÑALES PARA EL SORTING VACUOLAR

Las proteínas solubles y las proteínas de membrana, viajan a través de las estaciones primarias de la vía secretora. La mayoría de éstas son probablemente separadas de las proteínas destinadas a ser liberadas en la superficie celular, saliendo del aparato de Golgi (Sanderfoot & Raikhel, 1999). Por lo tanto, las proteínas solubles requieren una señal para el *sorting* vacuolar (secuencias señales para el *sorting* VSSs (*vacuolar sorting signals*), también denominadas secuencias específicas determinantes para el *sorting* vacuolar ssVSDs), que las distinga después de su salida del aparato de Golgi. Ciertamente, la ausencia de tales señales, indica la liberación de las proteínas solubles al espacio extracelular.

Se han descrito tres tipos de señales para el *sorting* vacuolar. Algunas proteínas vacuolares como la aleurina y la esporamina contienen propéptidos N-terminal (NTPP) como determinantes para el *sorting* (Holwerda *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1993; Kirsch *et al.*, 1994; Matsuoka & Neuhaus, 1999; Paris *et al.*, 1996). Estas contienen una secuencia NPIR (Asn-Pro-Ile-Arg) conservada. Otras como la lectina de la cebada, la faseolina, la quitinasa del tabaco y la 2S albúmina de la nuez del Brasil, contienen un propéptido C-terminal (CTPP) (Bednarek & Raikhel, 1991; Matsuoka *et al.*, 1995; Neuhaus *et al.*, 1994). De este tipo de señales no se tiene una secuencia consenso.

Otras proteínas vacuolares, tales como la fitohemaglutinina y la legumina, contienen señales para el *sorting*, en una región expuesta de la proteína madura (Tague *et al.*, 1990; Saalbach *et al.*, 1991).

2.1.2 BP-80

La BP-80 fue el primer VSR aislado de *Pisum sativum*, implicado en el reconocimiento de VSDs en el extremo N-terminal de la proaleurina (Kirsch *et al.*, 1994), para transportarla desde el aparato de Golgi hasta la vacuola lítica (Humair *et al.*, 2001; Paris & Neuhaus, 2002). BP 80 es una proteína integral de membrana que contiene un dominio transmembral (TDM) y una cola citosólica (CT) con un motivo basado en tirosina (YMPL) (Fig. 2). Este motivo es reconocido por el complejo AP1 en las CCVs (Ahmed *et al.*, 1997; Paris *et al.*, 1997; Shimada *et al.*, 1997; Sanderfoot *et al.*, 1998). En el extremo N-terminal de BP 80 existen tres regiones mayores: una región homóloga al dominio luminal de la proteína ReMembr-H2 (RMR), considerada por algunos autores como un dominio PA (asociado a Proteasas) (ver Fig. 1) (Paris *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2000; Mahon & Bateman, 2000; Masclaux *et al.*, 2005), seguida por un dominio central único “*VSR specific Domain*” y tres repeticiones del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en el extremo C-terminal. El dominio luminal de BP-80 tiene dos sitios de unión, los cuales reconocen dos ligandos diferentes (Cao *et al.*, 2000). El sitio de unión NPIR se localiza dentro de la región N-terminal y se une con alta afinidad al motivo NPIR de las proteínas, el otro sitio de unión no específico comprende el dominio central y las tres repeticiones EGF.

Cao *et al.*, (2000) plantearon, que la región homóloga al dominio RMR, junto con el dominio central “*VSR specific domain*”, determinan posiblemente, un sitio específico de unión para ligandos que contiene motivos NPIR, y que un fragmento del dominio central, mas el dominio C-terminal, podrían unirse de forma no específica al NPIR en el ligando (Fig. 2 y 3).

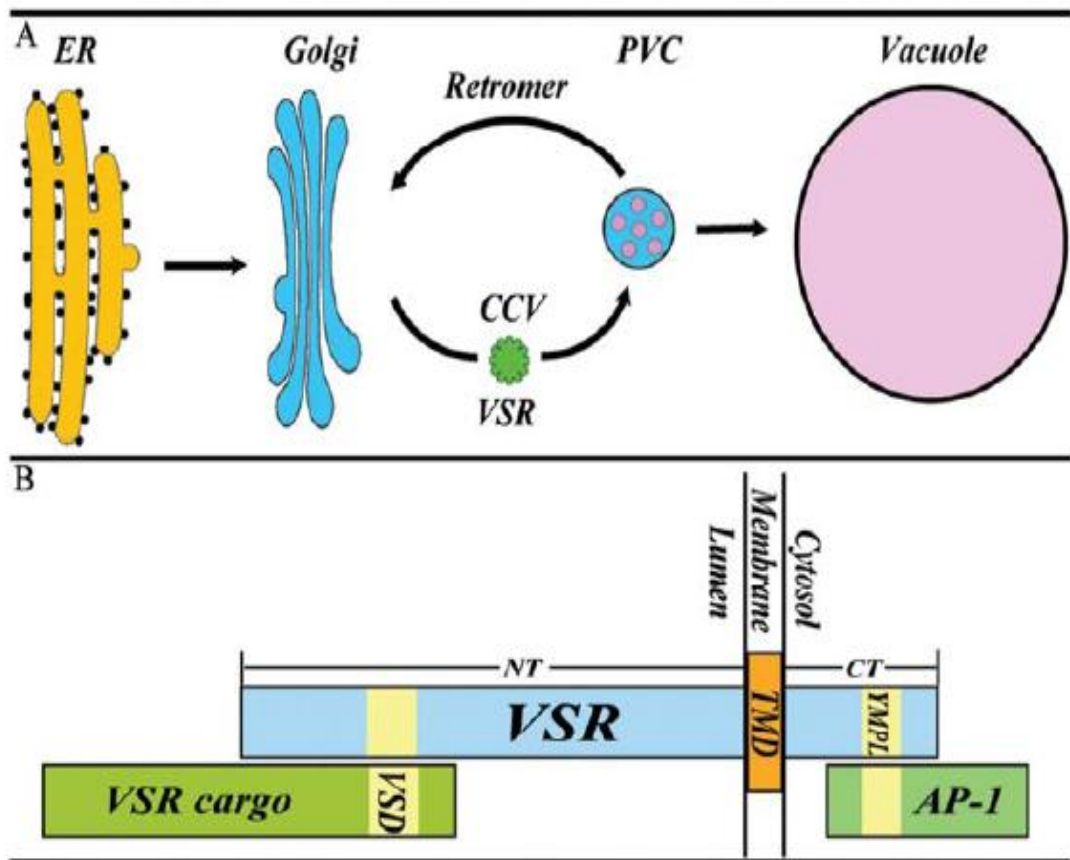


Fig. 2: Modelo del tráfico mediado por receptores en la vía secretora vegetal. (A) proteínas vacuolares alcanzan la vacuola desde el RE, pasando por el aparato Golgi hacia un compartimento prevacuolar (PVC) ayudadas por VSRs que se transportan en CCVs (Jiang & Rogers, 2003). (B) posible interacción entre un VSR y su ligando. N-terminal (NT). Determinantes del *sorting* vacuolar (VSD). C-terminal (CT). YMPPL región conservada que interactúa con el complejo adaptador AP1. (Miao *et al.*, 2007)

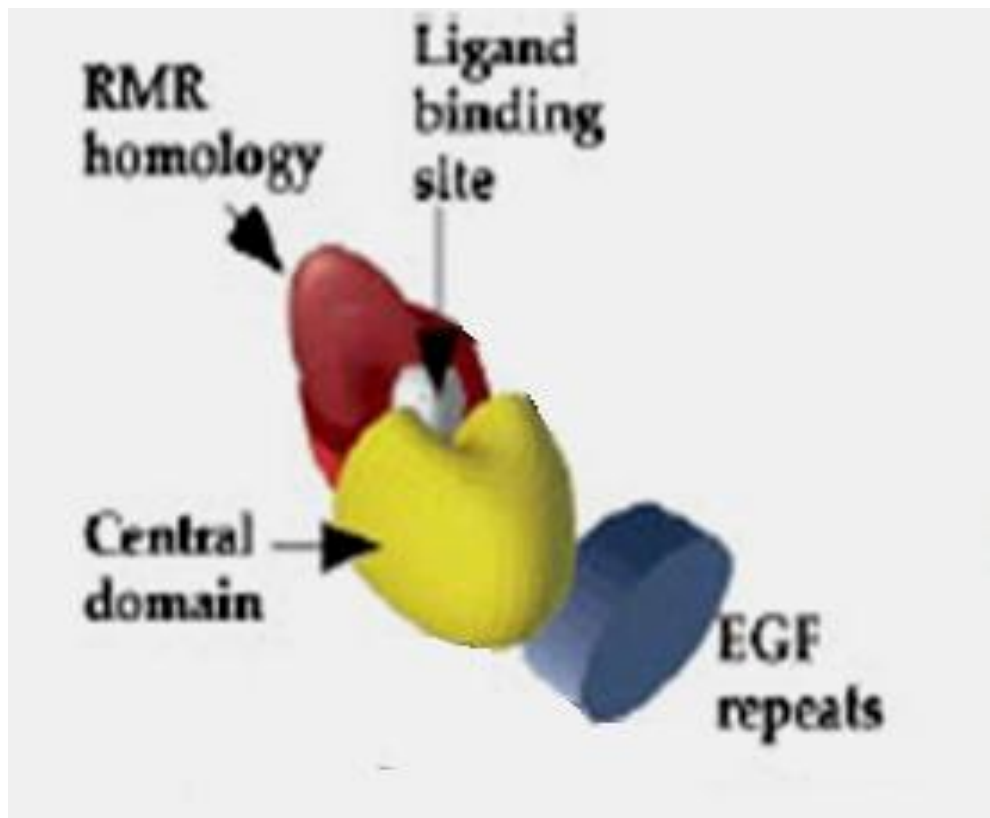


Fig. 3: Modelo estructural de la región N-terminal BP80: La región homóloga al dominio RMR está indicada en rojo, el dominio central “*VSR specific domain*” en amarillo, las repeticiones EGF en azul y los sitios específicos de unión a ligandos NPIR se observan en blanco. Las formas de los dominios son solamente para propósitos de ilustración (Adaptado de Cao X. *et al.*, 2000).

En *Arabidopsis thaliana* se han descrito siete isoformas de BP-80, conocidas como AtVSR1-7 (Paris & Neuhaus, 2002; Shimada *et al.*, 2003; Masclaux *et al.*, 2005). Estas isoformas presentan las mismas características: una larga región luminal en el N-terminal, que contiene un dominio PA, seguido del dominio central único y en la zona del C-terminal contiene varias repeticiones EGF y un motivo basado en tirosina (Paris *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2000; Mahon & Bateman, 2000; Masclaux *et al.*, 2005). En semillas de calabaza se encontró una proteína homóloga, la PV72 (Shimada *et al.*, 1997).

Un nuevo tipo de VSRs ha sido reconocido, este tipo de proteínas pertenecen a la familia de proteínas RMR, que contienen una cola citosólica de 50 a.a., la cual lleva un dominio RING-H₂ (RING-*finger*) seguido de una región rica en serina (Jiang *et al.*, 2000), además un dominio homólogo al dominio PA N-terminal de la BP-80 (Park *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2000). Las proteínas que contienen el dominio RING-H₂ están involucradas en el tráfico de membrana en las vacuolas de levaduras. En la estructura de estas proteínas no se encuentran EGFs. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se ha hallado seis homólogos, AtRMR1-6. Probablemente este tipo de proteínas, están involucradas en el transporte hacia las PSVs en *Arabidopsis thaliana* (Park *et al.*, 2005, 2007).

Becker & Hoef-Emden (2009) analizando el dominio PA, las repeticiones EGF, el dominio transmembranal y el motivo YMPL en la cola citoplasmática de los VSRs vegetales, proponen, que el ancestro VSR en viridiplanta, posiblemente presentaba un péptido señal en el extremo N-terminal, un motivo YMPL conservado en el extremo C-terminal con un dominio transmembranal y quizá uno o varios dominios EGF, estas características ha pasado a la descendencia del linaje verde, dándose la duplicación genética en clorófitas y diatomeas. Propone además que el paso de VSRs a los cromalveolados se dio por transferencia horizontal de genes (Fig. 4).

Otros estudios basados en las regiones ricas en cisteína de los VSRs vegetales (repeticiones EGF), los señalan como posibles ortólogos de las subunidades 1 y 5 de la β -integrina humana (Tamkun *et al.*, 1986; Laval *et al.*, 1999).

Respecto al dominio central de las VSRs vegetales, no se han realizado estudios que sugieran alguna relación funcional o estructural con otros dominios ya identificados.

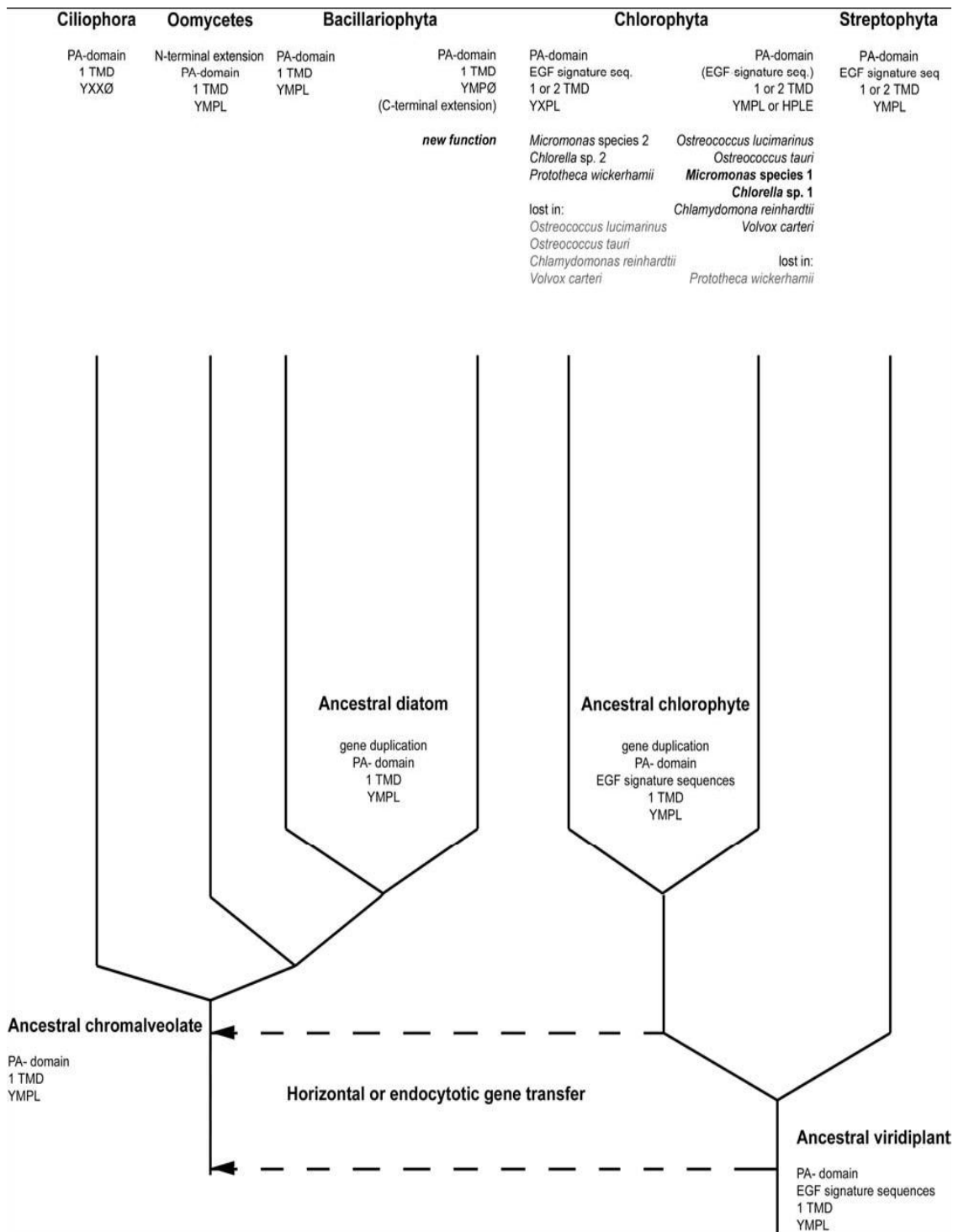


Fig. 4: Evolución de los VSRs vegetales en viridiplantae y cromalveolados (Becker & Hoef-Ermden, 2009).

2.2. SORTING DE PROTEÍNAS HACIA LOS LISOSOMAS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS. FAMILIA VPS10P-D

En las células de mamíferos, el *sorting* de hidrolasas destinadas hacia el lisosoma es facilitado por el receptor de Manosa-6-fosfato (MPR) (Ghosh *et al.*, 2003). El complejo MPR-ligando es recluido dentro de CCVs en la red *trans* del aparato de Golgi, proceso mediado por el factor de ribosilación de ADP (ARF), GGas (*Golgi-localized γ -adaptin ear homology domain ARF binding protein*) y el complejo adaptador AP1 (Dell'Angelica *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2000; Costaguta *et al.*, 2001). Esto incluye las interacciones con motivos tirosina (YXX \emptyset^*) y dileucina (LL) en la cola citoplasmática de los MPRs. El complejo MPR-ligando es transportado en CCVs hasta los endosomas secundarios y éstos se encargan de liberar el ligando en el lisosoma. Dentro de los endosomas, el receptor se separa de su ligando y es devuelto al aparato de Golgi o llevado hacia la membrana plasmática donde se encarga del *sorting* de proteínas, desde el exterior celular hacia los lisosomas; el complejo receptor-ligando es introducido a la célula en CCVs y luego transportado en endosomas primarios hacia los endosomas secundarios, que son los encargados de liberar la proteína (ya separada del receptor) en el lisosoma (Fig. 5).

Otro receptor implicado en el *sorting* lisosomal es la sortilina, proteína integral de membrana, perteneciente a la familia Vps10p-D, junto con SorLA (LR11/SORL1, 250 kDa, receptor relacionado al *sorting* de proteínas con repeticiones tipo A) y los receptores expresados en el sistema nervioso central relacionados con el *sorting* de proteínas SorCS1-3 (130 kDa). Estos receptores son expresados en diferentes órganos, en tejido neural adulto o en desarrollo (Jacobsen *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1996; Hermey *et al.*, 1999; Rezgaoui *et al.*, 2001; Hampe *et al.*, 2001).

La familia Vps10p-D se caracteriza por portar el dominio Vps10p (*vacuolar protein sorting 10 protein domain*), también presente en las levaduras. Los

* Donde X es cualquier aminoácido y \emptyset es un grupo voluminoso de amino ácidos hidrofóbicos.

miembros de esta familia, contienen un dominio Vps10p situado en posición N-terminal (Fig. 6).

En la sortilina, considerada arquetipo de esta familia, presenta un único dominio Vps10p (a.a.133-754), mientras en los otros miembros se ha encontrado otros ectodominios no asociados (Fig. 6). Los receptores SorCS1-3 constan de un segmento rico en Leucina ubicado entre el Vps10p-D y la membrana plasmática. SorLA contiene adyacente a la membrana un dominio de repeticiones de tipo fibronectina, después un grupo de repeticiones LDL (*ligand-binding low density lipoprotein receptor*) tipo A, seguidas de un dominio EGF y varios motivos YWTD (β *propeller*) y por último, el dominio Vps10p. Después de sus segmentos transmembranales cada receptor lleva un pequeño dominio citoplasmático de 50 a 80 a.a. Los sitios funcionales como los motivos dileucina, tirosina y agregados ácidos, involucrados en el transporte intracelular y la endocitosis, han sido bien establecidos en la sortilina, SortLA y SorCS1 (Jacobsen *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2001).

Estos receptores son multifuncionales, ya que tienen la capacidad de unirse a diferentes ligandos, y están comprometidos en el *sorting* intracelular así como en la endocitosis. La sortilina media la rápida endocitosis de la lipoprotein lipasa 16, la neurotencina 11 y proformas del factor de crecimiento nervioso (pro NGF) (Nykjær *et al.*, 2004); así mismo puede transportar proteínas desde el aparato de Golgi hasta los endosomas (Jacobsen *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2001). Tanto la sortilina como SorLA se unen a una gran variedad de ligandos tales como RAP (proteínas asociadas al receptor), la neurotencina, la lipoprotein lipasa, apolipoproteínas (Petersen *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1999; Jacobsen *et al.*, 2001).

Esta familia incluye además la proteína de unión al activador de cabeza en *Chlorohydra viridissima* (HAB), un receptor para el neuropéptido activador de cabeza, el cual controla la diferenciación de los procesos específicos de la cabeza en pólipos de agua dulce (Hampe *et al.*, 1999) (Fig. 6).

El dominio Vps10p característico de los miembros de esta familia, presenta una zona denominada 10CC (contiene diez cisteínas conservadas) en extremo C-terminal. Westergaard *et al.*, (2004), demostraron que esta región 10CC es el segmento de mayor unión a ligados, en la sortilina. La estructura del dominio Vps10p no ha sido reportada, pero posiblemente el dominio Vps10p adopta la estructura de un β -propeller (Paiardini & Caputo, 2008).

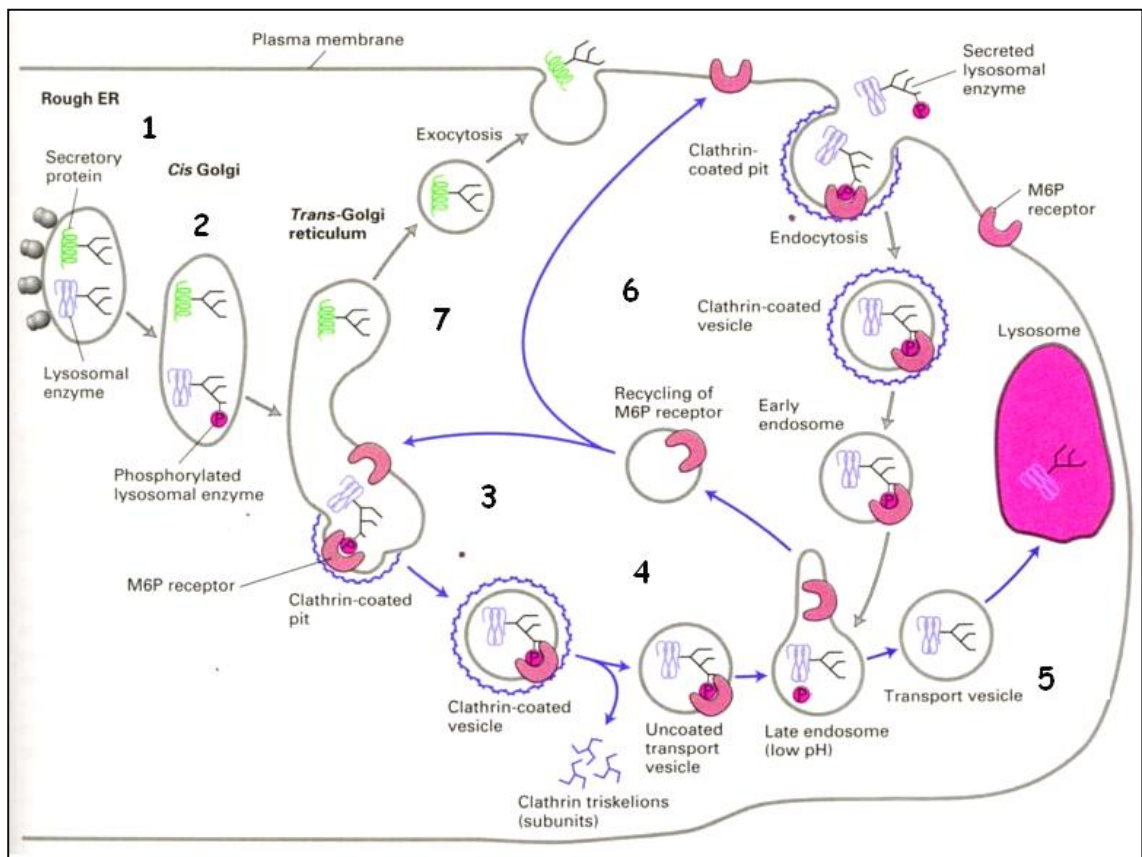


Fig. 5: *Sorting* de proteínas lisosomales hacia los lisosomas en mamíferos: 1. Síntesis de proteínas en el retículo endoplasmático. 2. Transporte y fosforilación de las proteínas en la red *trans* del aparato de Golgi. 3. Formación del complejo receptor-ligando y transporte del mismo en vesículas cubiertas de clatrina hacia los endosomas secundarios. 4. Disociación del complejo receptor-ligando gracias al pH neutro de los endosomas y liberación de la proteína en el lisosoma. 5. Envío del receptor al aparato de Golgi o a la membrana plasmática. 6. Endocitosis de proteínas lisosomales, 7. Exocitosis de proteínas, transportadas desde el aparato de Golgi hacia el exterior celular. (Modificado de [216.221.200.61/ywww/zbsw\(E\)/edetail7.htm](http://216.221.200.61/ywww/zbsw(E)/edetail7.htm).)

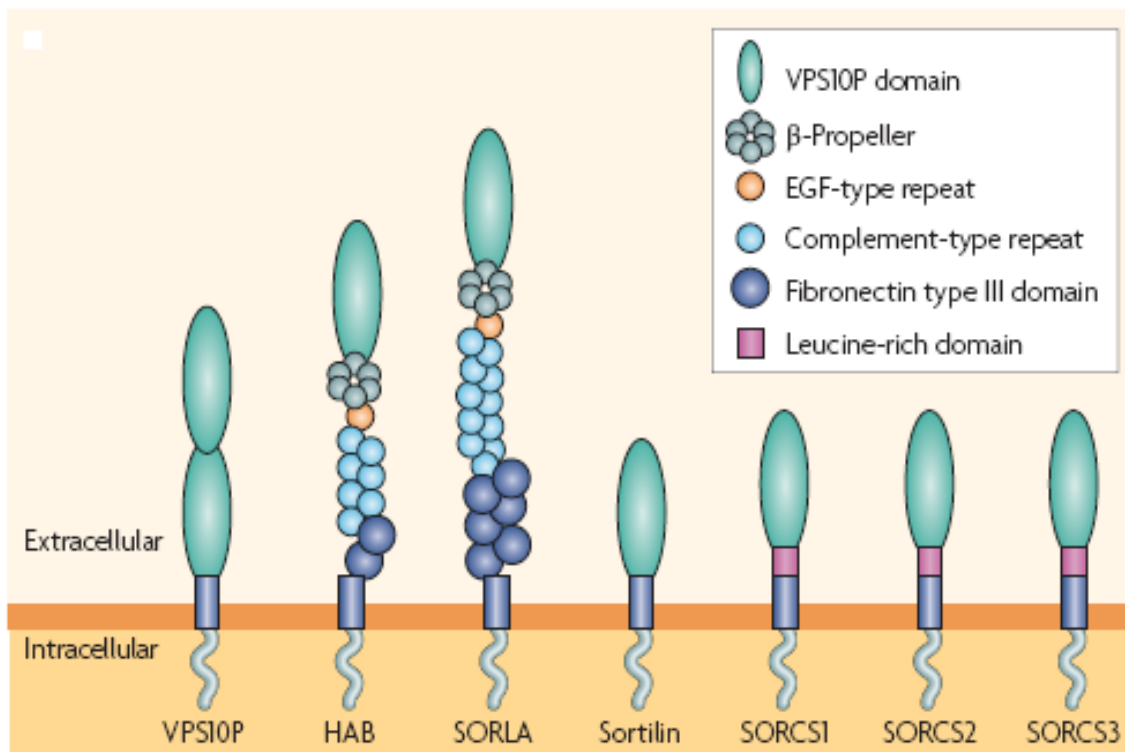


Fig. 6: Descripción estructural de los miembros de la familia Vps10p (Willnow *et al.*, 2008)

2.3 SORTING DE PROTEÍNAS EN LEVADURAS

En las levaduras existen vacuolas líticas, consideradas también como lisosomas por compartir características con estos últimos, ya que la vacuola de las levaduras es un orgánulo de naturaleza ácida, comprometido en la degradación de macromoléculas y sirve como depósito de aminoácidos, iones y polifosfatos (Klionsky *et al.*, 1990).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el *sorting* y liberación de proteínas en las LV (*lytic vacuole*) es muy similar a la vía MPR de células de mamíferos, ya que es dependiente de clatrina e implica la interacción entre el complejo adaptador AP1, GGA, y la cola citoplasmática del receptor Vps10p (Deloche *et al.*, 2001).

El receptor para el *sorting* vacuolar de la carboxypeptidasa Y (CPY) es una proteína transmembranal tipo 1 (178 kDa) de 1579 residuos, que presenta una secuencia señal en su región N-terminal (a.a. 1-21) y dos grandes dominios Vps10p, el primero comprende 45-728 a.a. y el segundo inicia en el a.a. 752 y termina en el a.a. 1383. Además, presenta un dominio transmembranal de 17 a.a. (1392-1413) y una cola citoplasmática de 164 a.a. (Fig. 6).

Las CCVs median el transporte del complejo CPY-receptor, desde el TGN (*trans Golgi network*) hasta los endosomas. Al parecer el dominio C-terminal del Vps10p juega un papel más importante en la recuperación del Vps10p de los compartimentos prevacuolares que en el *sorting* desde el TGN (Deloche *et al.*, 2001).

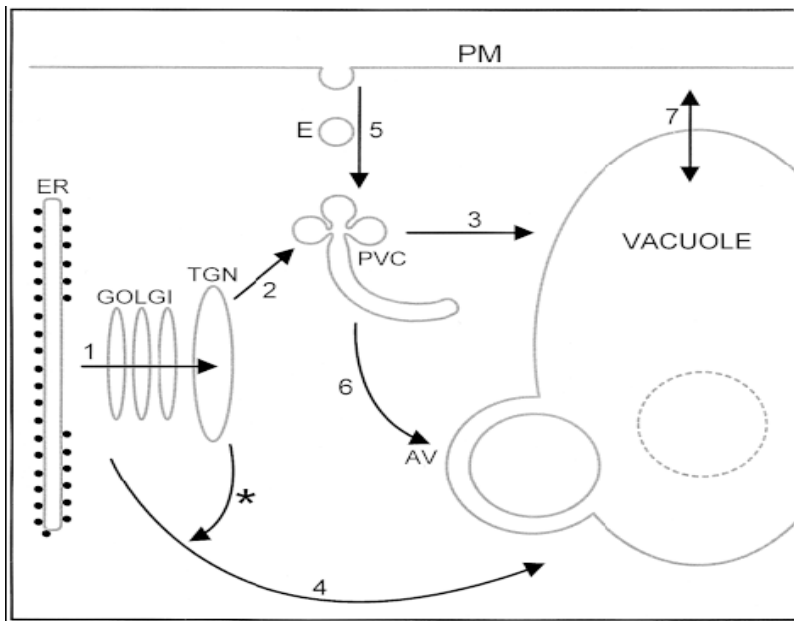
2.4. LA VÍA SECRETORA Y LA VÍA ENDOCÍTICA

Se conoce como vía secretora (vía biosintética), al trayecto que siguen las proteínas dentro de la célula, para ser transportadas desde el retículo endoplasmático hacia los lisosomas o a las vacuolas. Los mecanismos de entrada de proteínas exógenas a la célula, para ser transportadas hacia lisosomas o vacuolas comprende la vía endocítica. Estas vías, también involucran los procesos de autofagia, en la formación de nuevas vacuolas o lisosomas. El mecanismo básico que organiza estas vías en eucariotas está altamente conservado (Battey *et al.*, 1999).

Los orgánulos envueltos en estos sistemas son: el retículo endoplasmático (ER), el aparato de Golgi, las vacuolas, los lisosomas, los compartimentos endosomales y pre-vacuolares y la membrana plasmática.

Las proteínas vacuolares son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso y traslocadas en el retículo endoplasmático. Desde allí, las proteínas son llevadas en vesículas hasta las vacuolas, pasando antes por el aparato de Golgi (Vitale & Raikhel, 1999; Vitale & Galili, 2001). La transferencia de las proteínas desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi se denomina vía secretora temprana y el *sorting* de éstas desde el aparato de Golgi hasta la vacuola o los lisosomas pasando por los compartimentos endosomales o prevacuolares, se denomina vía secretora tardía (Pedrazzini *et al.*, 1997; Frigerio *et al.*, 1998; Dupree & Sherrier, 1998).

Son siete trayectos básicos los recorridos para la biogénesis, mantenimiento y abastecimiento de las vacuolas (Fig. 7).



PM: membrana plasmática.
PVC: compartimentos prevacuolares.
TGN: red trans del aparato de Golgi.
ER: retículo endoplasmático.
E: endosoma.
AV: vacuola autofágica.

Fig. 7: siete trayectos básicos recorridos para la biogénesis, mantenimiento y abastecimiento de las vacuolas. 1: la entrada y transporte en la vía secretora temprana (desde el retículo endoplasmático a los compartimentos del aparato Golgi). 2: la selección de proteínas vacuolares en la red *trans* del aparato de Golgi (TGN) a los compartimentos prevacuolares (PVC) pasando por la vía biosintética vacuolar. 3: transporte desde los Compartimento prevacuolares (PVC) a la vacuola por medio de la vía biosintética vacuolar tardía. 4: transporte desde el ER al aparato de Golgi y después hacia la vacuola, por rutas alternativas con posible aumento de material desde el aparato Golgi. 5: ruta endocítica desde la superficie celular a la vacuola con ayuda de endosomas. 6: del citoplasma a la vacuola por medio de autofagia por la vías degradativa o biosintética. 7: transporte de iones y solutos, cruzando el tonoplasto. (Marti, 1999).

2.5. LA VACUOLA

Las vacuolas son compartimentos intracelulares, producto de la vía secretora en las células vegetales; están rodeadas por el tonoplasto, membrana que contiene numerosos canales que median el transporte de iones y compuestos entre el interior de la vacuola y el citoplasma (Jaquinod *et al.*, 2007, Schmidt *et al.*, 2007). La mayoría de las vacuolas parecen contener, ATPasas-H⁺ vacuolares, pirofosfatasas y acuaporinas TIP (proteína intrínseca del tonoplasto). (Hirschi *et al.* 2004; de Angeli, 2006).

Las vacuolas, funcionan como reservorio para iones y metabolitos, incluyendo pigmentos y son cruciales para el proceso de detoxificación y la homeostasis celular. La vacuola es el mejor sitio para almacenar CA²⁺ y oxalato de Calcio (Geisler *et al.*, 2000). Por otra parte está involucrada en la respuesta celular al ambiente (humedad, nutrientes, suelos, agua) y los factores bióticos (virus, bacterias, hongos patógenos, insectos) que pueden producir estrés. En los órganos vegetativos de las plantas, las vacuolas actúan en combinación con la pared celular para generar la turgencia, la fuerza de conducción y el crecimiento celular. En las semillas y tejidos especializados en el almacenamiento, las vacuolas sirven como sitios de reserva de proteínas y carbohidratos solubles (Boller & Kende, 1979; Klionsky *et al.*, 1990).

Las vacuolas están relacionadas ontogénica y funcionalmente con otros componentes del sistema vacuolar, tales como los cuerpos membranosos vacuolares. La evidencia experimental sugiere que el material vacuolar interno en las plantas proviene de la confluencia de la ruta biosintética intracelular y la ruta endocitótica coordinada. Estas rutas biogénicas incluyen, (1) *sorting* de proteínas destinadas por la vacuola fuera de ella, para ser liberadas a la superficie celular, después de transitar a través de los primeros estadios de la vía secretora; (2) endocitosis de materiales desde la membrana plasmática; (3) autofagia para la formación de vacuolas y (4) liberación directa de la vacuola al citoplasma (Herman, 1994; Okita & Rogers, 1996).

2.5.1 TIPOS DE COMPARTIMENTOS VACUOLARES

En las células vegetales se han reconocido varios tipos de vacuolas con propiedades funcionales y físicas diferentes: las vacuolas para el almacenamiento de proteínas, PSV (*protein storage vacuole*) y las vacuolas líticas LV, que se diferencian por la presencia de la Acuaporina α -Tip (proteína intrínseca del tonoplasto) y γ -Tip, respectivamente (Jauh *et al.*, 1999; Fung *et al.*, 2005) (Hoh *et al.*, 1995; Paris *et al.*, 1996; Di Sansebastiano *et al.*, 1998; Neuhaus & Rogers, 1998; Swanson *et al.*, 1998).

Las LVs son equivalentes a los lisosomas de las células de mamíferos y a las vacuolas de las levaduras; contienen enzimas hidrolíticas que funcionan en un ambiente ácido para la degradación de proteínas (Paris *et al.*, 1996).

Por otra parte las PVSs son encontradas en vacuolas especializadas en frutos y semillas y también son sintetizadas y acumuladas en tejidos vegetativos especializados en respuesta a daños y cambios medioambientales (Paris *et al.*, 1996; Staswick, 1990; Herman, 1994; Jauh *et al.*, 1998).

Otros tipos de vacuolas son: las vacuolas vegetativas (neutrales) para almacenamiento y las vacuolas híbridas. Se ha demostrado que las vacuolas neutrales y las LVs son regeneradas por protoplasto evacuado en células de *Nicotiana tabacum*. Estas son también acumuladas en células vegetativas especializadas, en respuesta a deterioros o cambios en el ambiente y su tonoplasto contiene δ -TIP acuaporinas (Jauh *et al.*, 1998; Neuhaus & Rogers, 1998; Park *et al.*, 2004).

Algunas vacuolas pueden llevar dos diferentes tipos de proteínas intrínsecas del tonoplasto (Jauh *et al.*, 1999). En plantas como la soya, al ser sometidas a cambios en las condiciones fisiológicas, se ha observado la conversión de vacuolas líticas a vacuolas vegetativas de almacenamiento. Lo anterior

complica la clasificación de las vacuolas de acuerdo a la clase de TIPs que presenten. Además, se han hallado TIPs diferentes a las acuaporinas; por ejemplo, la DIP (*Dark Induced Protein*) en los ápices de las raíces y semillas en desarrollo (Culianez-Macia & Martin, 1993).

Las células vegetales pueden presentar tres tipos de vacuolas con diferentes funciones en una sola célula: vacuolas líticas, vacuolas neutrales y vacuolas para el almacenamiento de proteínas (Hoh *et al.*, 1995; Paris *et al.*, 1996; Di Sansebastiano *et al.*, 1998; 2001).

2.6. EL LISOSOMA

Los lisosomas son organelos citoplasmáticos membranosos, que sirven como el mayor sitio de degradación en las células eucariotas (Holtzmann, 1989; Hunziker & Geuze, 1996). Tanto las moléculas endógenas como las moléculas exógenas pueden ser liberadas a los lisosomas a través de las vías biosintética y endocítica respectivamente. Los lisosomas también pueden degradar proteínas transportadas desde el citosol (Cuervo & Dice, 1998; Kornfeld & Mellman, 1989). La función lítica de estos organelos es llevada a cabo por más de 50 hidrolasas (ej. Proteasas, lipasas, glicosidasas) (Cuervo & Dice, 1998) presentes en su interior, que dependen de un pH ácido (4.6-5.0) (Ohkuma & Poole, 1978).

2.7. CLATRINA

Es una proteína que constituye las membranas recubiertas de clatrina y las vesículas cubiertas de clatrina (CCVs), formadas durante la endocitosis de materiales en la superficie celular (Pearse, 1976).

Las membranas cubiertas de clatrina están formadas, por cadenas pesadas (~190 kDa) (Kirchhausen, 2000) y por cadenas livianas de proteína (~190 kDa) que, forman una estructura llamada “triskelión” (Fotin *et al.*, 2004) (Fig. 8).

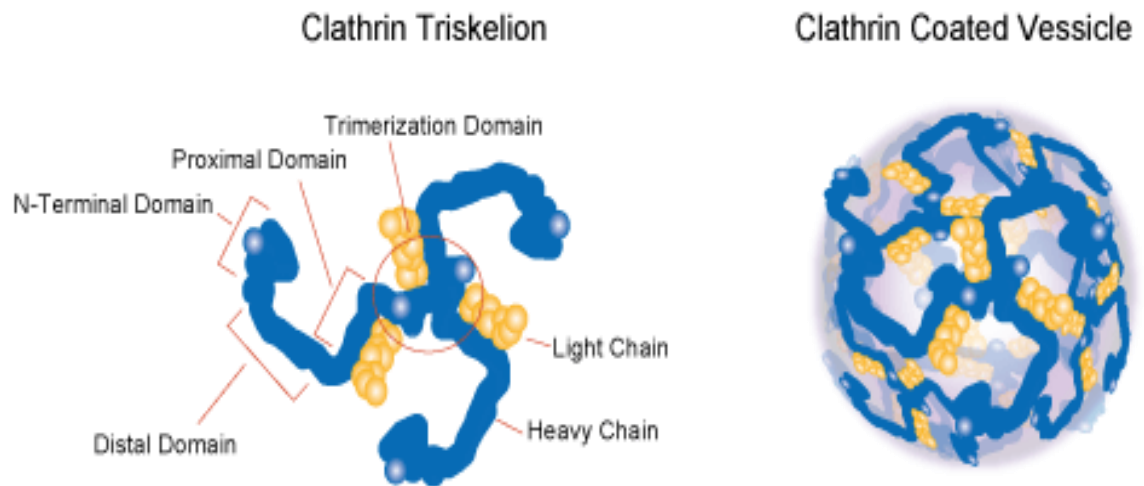


Fig. 8: Representación gráfica del triskelión: las cadenas pesadas están representadas en azul y las cadenas livianas en amarillo (tomado de www.siamaldrich.com/.../clathrin.html).

En algunos organismos tales como las levaduras, un triskelión solo presenta cadenas pesadas y un tipo sencillo de cadena liviana, mientras que en mamíferos puede tener dos tipos de cadenas livianas (tipo A y B). Posiblemente, la clatrina presente en plantas tiene más de un tipo de cadena liviana (Robinson *et al.*, 1998).

Las moléculas de clatrina son reclutadas con la ayuda de proteínas adaptadoras en un segmento de membrana que está destinado a ser

incorporado dentro de la vesícula. AP180 es uno de estos adaptadores; se une a la clatrina y dirige el ensamble de las vesículas (Fig. 9). La epsina también recluta clatrina y promueve su polimerización, ayudando en la formación de los sacos (Ford *et al.*, 2001; Ford *et al.*, 2002). Los adaptadores AP se acoplan al ensamble de clatrina para incorporar ciertas clases de proteínas. Por ejemplo, el complejo AP-2 dirige la endocitosis de receptores de ligandos como la transferrina, proteínas de baja densidad y el factor de crecimiento epidérmico. Los receptores son transferidos al endosoma, desde el cual son regresados a la superficie celular o remitidos al lisosoma. De igual forma, el complejo AP-1 dirige la incorporación del receptor de la manosa 6 fosfato y el complejo AP-3 se encarga del receptor de tirosinasa (Ohno *et al.*, 1995) (Fig. 9).

La dinamina es la proteína encargada de la invaginación (*pinching*) de las membranas, para culminar la gemación (*budding*) de las vesículas.

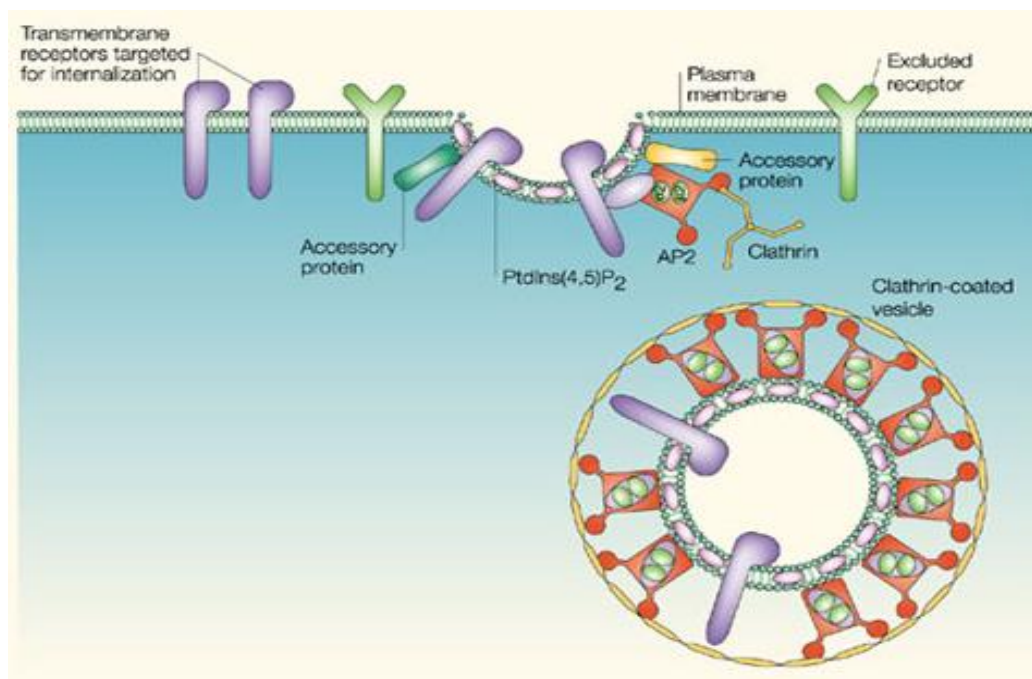


Fig. 9: organización de las vesículas cubiertas de clatrina: aquí se representan la posición de los receptores transmembranales, que intervienen en la internalización de las proteínas, así como los complejos adaptadores; por ejemplo, el AP2 y la forma como se posicionan los triskeliones y todos los demás elementos para formar una vesícula cubierta de clatrina (Wendland, 2002).

Después de la estrangulación de las vesículas, el revestimiento de clatrina se desprende, quedando libre la proteína para ser reutilizada en la formación de

nuevas CCPs (*clathrin coated pits*). Las vesículas que no están recubiertas con clatrina se fusionan con los endosomas, para liberar su contenido en ellos; estas membranas retornan a la superficie celular (Wakeham *et al.*, 2003) (Fig. 10).

Las CCVs fueron primero descritas y halladas en células eucariotas (Kirchhausen, 2000). Han sido encontradas en la TGN y la PM (*plasma membrane*) y están envueltas en el *sorting* hacia ambos orgánulos.

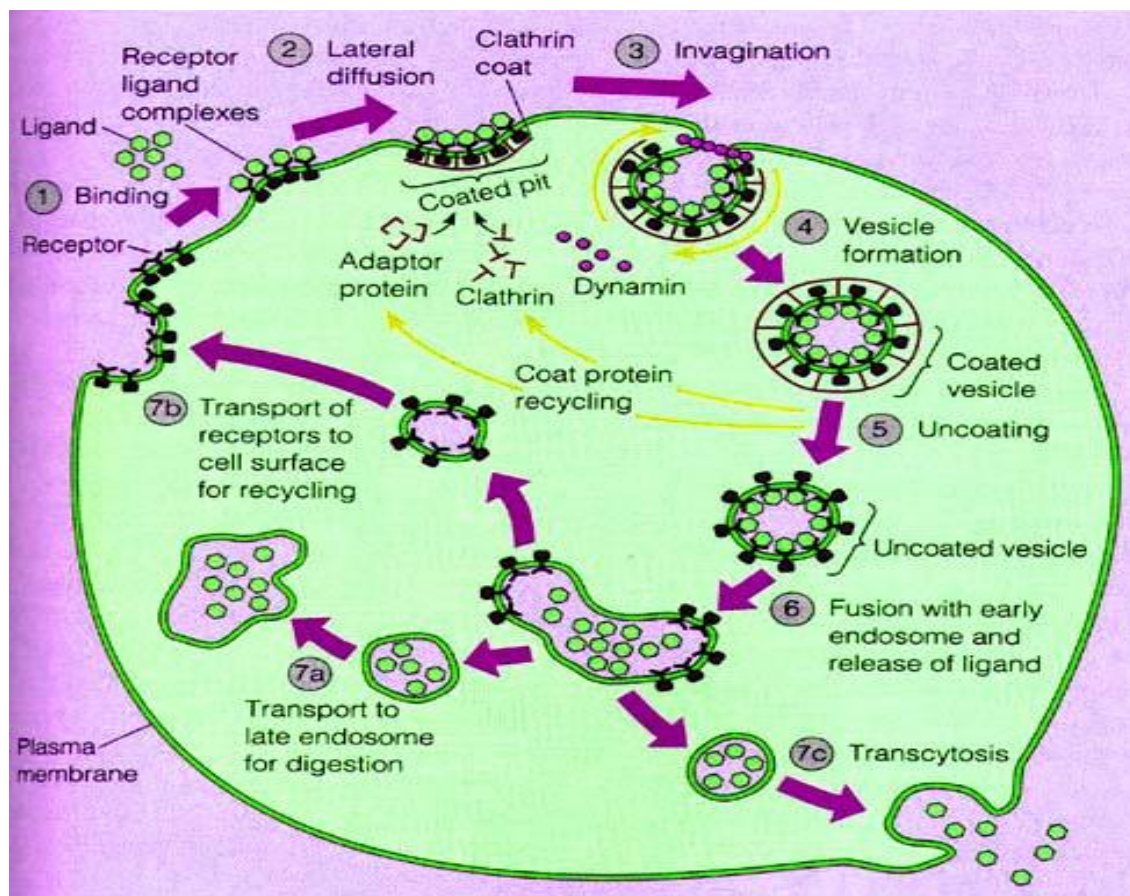


Fig. 10 papel de las CCVs en la endocitosis mediada por receptores (tomado de [219.221.200.61/ywww/zbsw\(E\)/edetail5.htm](http://219.221.200.61/ywww/zbsw(E)/edetail5.htm)).

3. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Analizar las relaciones estructurales y funcionales del dominio *VSR-specific domain* de los receptores vegetales vacuolares VSR, con proteínas similares de animales y levaduras, por medio del Análisis de *Clusters* Hidrofóbicos (HCA).

2. Objetivos específicos

1. Constituir el grupo más grande posible de proteínas de plantas, hongos y animales, de mayor identidad con el dominio *VSR-specific domain* de *Arabidopsis thaliana* y leguminosas.
2. Alinear mediante HCA las secuencias obtenidas.
3. Predecir las características estructurales y funcionales del dominio *VSR-specific domain* con base en los alineamientos.
4. Establecer las relaciones estructurales y funcionales del dominio *VSR-specific domain* entre las especies vegetales de las cuales se haya publicado la secuencia del dominio en estudio.

4. METODOLOGÍA

De la secuencia proteica del VSR BP-80 de *Pisum sativum* (sp|P93484.1|VSR1_PEA), se apartó el fragmento correspondiente al dominio central, *VSR specific domain* (a.a. 163-411) (www.uniprot.org/uniprot/p934484), con el fin de realizar la búsqueda de otras secuencias que compartieran alguna identidad con la secuencia aminoacídica del *VSR specific domain*. Dichas búsquedas se realizaron en la base de datos del Centro Nacional para la información Biológica (NCBI), usando PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Se consultaron otras bases de datos como SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (Ponting *et al.*, 1999) y Pfam (*Protein Families*) (Bateman *et al.*, 2004), para detectar la presencia de dominios ya clasificados.

Las secuencias que mostraron identidades menores del 60% fueron seleccionadas para realizar los alineamientos HCA.

Se estudió de la estructura secundaria del *VSR specific domain*, mediante el análisis de agregados hidrofóbicos HCA. La representación 2D de las secuencias (graficas HCA) se realizo en línea, utilizando el servidor de la SMI (*Salle de Modélisation et d'Imagerie Moléculaire de l'Université Paris 6*) (<http://psb00.snv.jussieu.fr/>). (Callebaut *et al.*, 1997).

Para observar posibles similitudes estructurales entre las distintas secuencias seleccionadas y el *VSR specific domain*, se alinearon los gráficos HCA de cada secuencia con el del *VSR specific domain*. Para todos los alineamientos fue calculada la identidad (Callebaut *et al.*, 1997) y el *HCA score* (Gaboriaud *et al.*, 1987) fue calculado para los alineamientos HCA que presentaron identidades menores al 50%.

Calculo *HCA score*:

$$\text{HCA score}(\%) = (2 \times \text{MHA}/\text{THA}) \times 100$$

Donde: MHA total de aminoácidos hidrofóbicos emparejados en el alineamiento. THA total de aminoácidos hidrofóbicos contenidos en cada una de las secuencias.

.

Calculo de la identidad:

$$\text{Identidad HCA} = \frac{\text{a.a. hidrofóbicos coincidentes} + \text{a.a. no hidrofóbicos coincidentes}}{\text{Numero total de a.a. de la secuencia de mayor tamaño}} \times 100$$

5. RESULTADOS

Las búsquedas realizadas en la base de datos del NCBI (*Genbank*) por medio de PSI-BLAST, con la secuencia proteica del *VSR specific domain* de *Pisum sativum* (a.a. 163-411), arrojaron secuencias provenientes de plantas superiores tanto angiospermas como gimnospermas. También se obtuvieron secuencias procedentes de briofitos, algas, protozoos y bacterias. Las secuencias halladas en estas búsquedas presentaron identidades desde 89% (*Populus trichocarpa*), hasta 21% (*Paramecium tetraurelia*).

5.1 PRESENCIA DEL VSR SPECIFIC DOMAIN EN EL LINAJE VIRIDIPLANTAE

Con la búsqueda en *Genbank*, se hallaron identidades entre el 62 y 89% en plantas superiores. En la tabla 1, se muestra la información de las clases de proteínas, las especies de angiospermas y gimnospermas en las que fueron halladas y la identidad que comparten sus secuencias a.a. con la del *VSR specific domain*. Las proteínas descritas como supuestas “*zinc finger*” o posibles VSRs presentaron las identidades más altas, en plantas superiores.

Tabla 1. Secuencias proteicas de angiospermas y gimnospermas que comparten mayor identidad con el *VSR specific domain*.

Clase de proteína	Especie	Código de acceso	Identidad BLAST
<i>Putative EGF receptor-like protein</i>	<i>Helianthus annuus</i>	CAC38995	62%
<i>Vacuolar sorting receptor protein</i>	<i>Lilium longiflorum</i>	ACS91931	79%
<i>Putative sorting receptor</i>	<i>Hordeum vulgare subsp vulgare</i>	ABZ85676	80%
Desconocida	<i>Picea sitchensis</i>	ABR17707.1	81%
<i>Vacuolar sorting receptor 3 precursor</i>	<i>Zea mays</i>	ACG44286	84%
<i>Hypothetical protein</i>	<i>Vitis vinifera</i>	CAN79862	85%
<i>Zinc finger protein, putative</i>	<i>Ricinus communis</i>	EEF34907	87%
Possible VSR (<i>predicted protein</i>)	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002298772	89%

Las identidades obtenidas en angiospermas y gimnospermas, indican la alta conservación del *VSR specific domain* en plantas superiores.

La alta identidad obtenida entre el *VSR specific domain* y las hipotéticas proteínas *Zinc finger* y los posibles receptores tipo EGF, habré paso a la idea de la posible existencia del *VSR specific domain* en proteínas diferentes a los receptores para el *sorting* vacuolar, pero también se podría llegar a la conclusión de que estas proteínas hipotéticas son en realidad VSRs.

Con respecto a los briofitos, de la búsqueda en *Genbank* resultó una secuencia a.a. de *Physcomitrella patens* subsp. *patens* (XP 001759820), con una identidad del 73%, cuya función es desconocida. Se realizaron dos alineamientos HCA entre la anterior secuencia y el *VSR specific domain*: en el primero, se analizaron las secuencia a.a de la BP 80 (*Pisum sativum*) y la secuencia XP 001759820 completas, obteniendo una identidad del 69%. El segundo análisis se llevó a cabo entre el segmento correspondiente al *VSR specific domain* (163-411) (*Pisum sativum*) y la sección correspondiente (170-420) en la proteína XP 001759820, resultando una identidad del 78%. Estos resultados muestran que el *VSR specific domain* se halla bien conservado en un nuevo VSR presente en briofitos (Fig. 11 a y b).

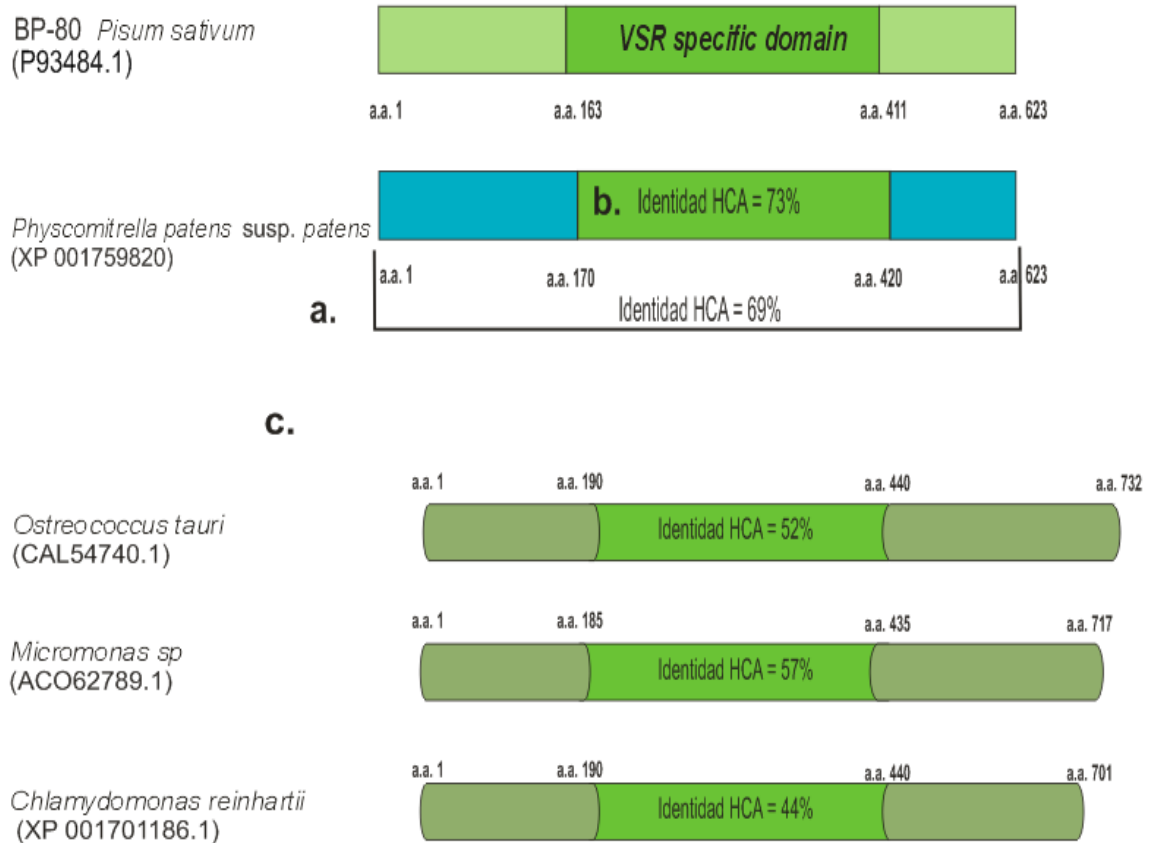


Fig. 11 presencia del VSR specific domain en briofitos y algas verdes: a. La identidad arrojada del alineamiento HCA entre el VSR BP-80 de *Pisum sativum* y una proteína de función incierta de *Physcomitrella patens* subsp. *Patens*; b. Identidad arrojada de un alineamiento HCA entre el VSR specific domain en *Pisum sativum* y la proteína de *Physcomitrella patens* subsp. *Patens* ya mencionada; c. Identidades arrojadas, por los alineamientos HCA realizados entre las secuencias a.a. de posibles VSRs en *Ostreococcus tauri*, *Micromonas* sp, *Chlamydomonas reinhartii* y la secuencia a.a. del VSR specific domain en *Pisum sativum*.

Las búsquedas en *Genbank* arrojaron secuencias registradas como “posibles receptores para el *sorting* vacuolar” en eucariotas unicelulares tales como *Ostreococcus tauri* (48%) (CAL54740.1), *Micromonas* sp (54%) (ACO62789.1) y *Chlamydomonas reinhartii* (40%) (XP 001701186.1).

Los análisis de agregados hidrofóbicos realizados entre el posible VSR de *Ostreococcus tauri*, *Micromonas* sp, *Chlamydomonas reinhartii* y el VSR specific domain (*Pisum sativum*), presentaron identidades del 52%, 57% y el

44%, respectivamente, indicando la presencia del *VSR specific domain* en secuencias proteicas de microorganismos fotosintéticos (Fig. 11c).

5.2 DOMINIO CENTRAL DE BP-80 CONSERVADO EN PROTISTAS.

También se obtuvieron secuencias a.a. provenientes de *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1055/1 (XP_002182623.1) y *Thalassiosira pseudonana* CCMP1335 (XP_002294134.1). PSI-BLAST arrojó identidades del 34% y 37%, respectivamente.

El análisis HCA se realizó por la alineación de la secuencia a.a. del *VSR specific domain* (*Pisum sativum*) y la secuencia a.a. XP_002182623.1 (a.a 187-426) hallada en *Phaeodactylum tricornutum*, mostrando una identidad del 40 % (Fig. 12, ver anexos).

En el caso de *Thalassiosira pseudonana* CCMP1335, se analizó su secuencia entera frente al dominio central de *Pisum sativum*, hallándose una identidad HCA de 40% entre el fragmento (a.a 205-460) de *Thalassiosira pseudonana* CCMP1335 y la secuencia proteica del *VSR specific domain* (Fig. 13, ver anexos).

Aunque las secuencias de diatomeas analizadas no se hallan descritas, las identidades obtenidas predicen la existencia del *VSR specific domain* en diatomeas, esto da indicios de un origen muy antiguo del *VSR specific domain* y su capacidad de adaptación a diferentes medios.

5.3 VSR SPECIFIC DOMAIN EN BACTERIAS

Otro resultado de la búsqueda en las bases de datos del NCBI, fue la secuencia de una proteína externa de membrana en la Alfa proteobacteria HTCC2255 (ZP_01448706), obteniéndose una identidad del 28%. En los alineamientos HCA pudimos observar una identidad del 29% (Fig.14a, ver

anexos); en esta comparación entre la proteína procariota y el *VSR specific domain*, llama la atención una región en especial (a.a. 160-230 en la Alfa proteobacteria Vs a.a 310-395 en el *VSR specific domain*) (Fig.14b) ya que en esta se alcanza una identidad del 40% entre las dos secuencias estudiadas.

Otro resultado del sondeo de secuencias en el *Genbank*, fue una secuencia a.a. de otra proteobacteria, *Plesiocystis pacifera* (zp_01911380.1), la cual presentó 35% de identidad. El análisis de agregados hidrofóbicos con el *VSR specific domain* dio una identidad del 32%. Además se realizó el alineamiento de los segmentos 320-410 y 230-300 del *VSR specific domain* y la secuencia bacteriana respectivamente, arrojando una identidad del 37% (Fig. 15, ver anexos).

Los datos anteriores estarían indicando un posible origen procariota del dominio en estudio. Ya que se cree que las alfa proteobacterias son los precursores de las mitocondrias en las células eucariotas, sería posible que el ancestro de *VSR specific domain* halla pasado a las células eucariotas por transferencia endocítica de genes de una bacteria fotosintetizadora como lo son las alfa proteobacterias.

5.4 SIMILARIDAD ENTRE EL *VSR SPECIFIC DOMAIN* Y LOS RECEPTORES LDL.

Con la secuencia aminoacídica del *VSR specific domain* de la BP 80 (*Pisum sativum*), se hizo una búsqueda específica para secuencias de proteínas animales en el NCBI usando PSI-BLAST. Esta búsqueda dio identidades del 50% con un receptor de lipoproteínas (*Leucophaea maderae*) (BAE00010) y del 35% con un receptor LDL presente en *Cricetulus griseus* (AAA51449).

Del análisis de agregados hidrofóbicos, entre estas proteínas animales y el *VSR specific domain* resultaron identidades del 28% para ambos casos (Fig. 16, ver anexos).

Aunque en este caso los porcentajes de identidad alcanzados con la secuencia primaria de las proteínas evaluadas, son más altos que los porcentajes de identidad obtenidos mediante los alineamientos HCA, se debe recordar que los valores arrojados por el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas son producto de alineamientos locales de PSI-BLAST (*position specific iteration*). Por tanto las regiones de los receptores LDL que presentaron 50 y 35% de identidad con PSI-BLAST, son más cortas que las regiones pertenecientes a las mismas proteínas, analizadas mediante HCA. Las regiones en BAE00010 y AAA51449, que muestran 28% de identidad con el *VSR specific domain*, están registradas en SMART y PFAM como β -propellers (Springer, 1998; Jeon *et al.*, 2001). Se ha sido demostrado que los β -propellers participan en la liberación de las lipoproteínas en ambientes con pH neutro como el del endosoma (Rudenko *et al.*, 2002).

5.5 RELACIONES ESTRUCTURALES ENTRE EL *VSR SPECIFIC DOMAIN* Y LOS DOMINIOS *VPS10P*.

Además de las secuencias elegidas de acuerdo a su identidad, obtenidas median PSI-BLAST, también fueron analizadas otras secuencias que por revisión bibliográfica se han considerado afines a este estudio, tales como las pertenecientes a la familia Vps10p-D en mamíferos: sortilina (CAA66904), SorLA (NP_003096), SorCS1 (Q8WY21), SorCS2 (Q96PQ02), así como el receptor de la carboxipeptidasa Y (Vps10p) (AAA18831) en *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque el nivel de identidad sea tan bajo que PSI-BLAST no las detecte.

a. Presencia de un β -propeller en el *VSR specific domain* y el dominio *Vps10p*

En este estudio se realizaron análisis de agregados hidrofóbicos entre el dominio Vps10p (a.a 133-754) de la sortilina, proteína arquetipo de la familia

Vps10p-D y el *VSR specific domain* (a.a. 164-411), notándose una identidad del 30% entre la región comprendida desde el a.a. 280 al 540 del dominio Vps10p (sortilina) y el *VSR specific domain* (Fig. 17, ver anexos).

A la vez se realizó un alineamiento HCA entre la región considerada β -propeller en la proteína animal AAA51449 analizada anteriormente y la secuencia proteica del dominio Vps10p de la sortilina (desde el a.a. 280 al 540), obteniendo 30% de identidad, dato que confirma que el dominio Vps10p de la sortilina es estructuralmente un β -propeller (Fig 18, ver anexos).

Ya que el *VSR specific domain* comparte 30% de identidad con el dominio Vps10p de la sortilina, es posible que estructuralmente el *VSR specific domain* también este conformado por un β -propeller.

b. Relación entre el *VSR specific domain* y el dominio VPs10p de la sortilina con homólogos procariotas

Ya que se obtuvo un alto porcentaje de identidad entre el dominio Vps10p de la sortilina y el *VSR specific domain*, con el fin de probar una posible relación del *VSR specific domain* y el dominio Vps10p con un ancestro bacteriano, se realizó el análisis de agregados hidrofóbicos, entre la secuencia a.a. de la alfa proteobacteria HTCC2255 y el dominio Vps10p de la sortilina, resultando una identidad del 29%.

Llama la atención, la región comprendida entre el aminoácido 450 al 530 del dominio Vps10p de la sortilina y la secuencia que va desde el a.a. 150 hasta el a.a. 235 de la proteína ZP_01448706 en la alfa proteobacteria HTCC2255, con los cuales se obtuvo se obtuvo una identidad del 38% (Fig. 19, ver anexos).

Los anteriores resultados indican que posiblemente el dominio Vps10p de la sortilina y el *VSR specific domain* se originaron de un mismo ancestro procariota, tal vez una alfa proteobacteria.

5.6 ANÁLISIS DE AGREGADOS HIDROFÓBICOS ENTRE *VSR SPECIFIC DOMAIN* Y LOS DOMINIOS VPS10P DE LA LEVADURA.

En las levaduras la proteína Vps10p (P32319), tiene dos dominios Vps10p; el primero va desde el aminoácido 45 al 728 y el segundo desde el a.a.752 al 1383. En la figura 20 se observan los análisis de agregados hidrofóbicos realizados entre el *VSR specific domain* y los dominios Vps10p de *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales dieron identidades del 32 y 27% respectivamente (Fig. 20, ver anexos). Estas identidades junto con las identidades obtenidas en los alineamientos HCA realizados entre el *VSR specific domain* y el dominio Vps10p de la sortilina, señalarían al *VSR specific domain* como un posible dominio Vps10p vegetal.

5.7 HCA SCORE

El HCA score fue calculado, para evaluar la conservación de los a.a. hidrofóbicos mostrada entre los gráficos HCA de las secuencias de las proteínas evaluadas. Fue calculado el HCA score para los alineamientos HCA que presentaron identidades menores al 50%, obteniéndose valores entre 56 y el 71% (tabla 2). Los valores mayores al 60% indican que hay un buen porcentaje de a.a. hidrofóbicos conservados entre las secuencias estudiadas.

Tabla 2. HCA score para los alineamientos HCA que obtuvieron identidades menores al 40%.

ALINEAMIENTOS	SCORE
XP_002182623.1(180-420)/VSR specific domain	69%
XP_002294134.1 (205-455)/VSR specific domain.	69%
ZP_01448706 / VSR specific domain (<i>Pisum sativum</i>)	56%
ZP_01448706 (155-235) / VSR specific domain (310-395)	69%
ZP_01911380.1 (80-300)/VSR specific domain	71%
VSR specific domain (160-285) / AAA51449 (440-590)	63%
BAE0010 (480-625) / VSR specific domain (160-285)	67%
VSR specific domain / CAA66904 dominio Vps10p (275-540)	69%
CAA66904 dominio Vps10p (260-410) / AAA51449 (440-590)	68%
CAA66904 dominio Vps10p (275-540) / ZP 01448706	65%
ZP 01448706 (145-235) / CAA66904 dominio Vps10p (450-530)	71%

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio se hizo una búsqueda exhaustiva de secuencias proteicas, con el fin de aportar información acerca de la estructura y función del *VSR specific domain* de la proteína BP-80 proteína arquetipo de los VSRs vegetales.

Los resultados obtenidos indican la presencia del *VSR specific domain* en organismos fotosintéticos, que viven en hábitats marinos y/o dulceacuícolas tales como las diatomeas y las algas verdes, así como en organismos terrestres como briofitos, gimnospermas y angiospermas, lo que indica que el *VSR specific domain* ha requerido de pocas mutaciones para adaptarse a nuevas condiciones de reacción y conservándose sobrellevando el paso a diferentes ambientes a través del tiempo.

Con respecto al origen de los VSRs tipo BP80, Becker & K. Hoef-Emden (2009) consideraron dos posibles situaciones:

1. Los VSRs vegetales son una invención eucariota antigua, retenida solo en cromalveolados (Stramenopiles: Pelagophytes, Oomycetes, Bacillariophytes), y viridiplantae.
2. Los VSRs vegetales estuvieron presentes en un común ancestro del linaje viridiplanta y los cromalveolados obtuvieron este tipo de receptores por transferencia de genes endocitótica u horizontal junto con un grupo de otros genes de proteínas de algas verdes, (Becker et al. 2008. (Bhattacharya and Nosenko 2008, Frommolt et al. 2008).

Una identidad del 30 y del 37% entre la secuencia aminoacídica de la proteobacteria *Plesiocystis pacifera* y el *VSR specific domain*, además de la alta identidad presentada (40%) entre la región a.a. 160-230 en la alfa proteobacterias analizada y el *VSR specific domain* (a.a. 310-395), nos lleva a

proponer el origen procariota del dominio *VSR specific domain*, producto tal vez, de una transferencia endocítica de genes bacterianos, posiblemente de bacterias con carácter fotosintético como las alfa proteobacterias, ya que se piensa que los precursores de las mitocondrias de las células eucariotas se han originado en este grupo bacteriano; de esta forma pasarían nuevos elementos al genoma eucariota.

6.1 RELACIÓN DEL *VSR SPECIFIC DOMAIN* Y B-PROPELLER

Paiardini & Caputo (2008) proponen que el dominio Vps10p en la sortilina lleva *β -propeller* en su estructura y actúa en conjunto con la región 10CC en la unión a ligandos (Quistgaard *et al.*, 2009). Por otra parte se ha sido demostrado que en los receptores LDL, el *β -propeller* participa en la liberación de las lipoproteínas en ambientes con pH neutro como el del endosoma (Rudenko *et al.*, 2002).

En este trabajo se obtuvieron identidades del 30% entre el *VSR specific domain* y las regiones descritas como *β -propeller* en receptores LDL, por lo tanto se podría suponer que esta región es importante en la unión a ligandos en el *VSR specific domain*. Cao *et al.*, (2000), proponen que una región entre el dominio central de la BP-80 y las repeticiones EGF, es la zona de unión a ligandos; esta zona no presenta especificidad para los motivos NPIR. Mediante los análisis HCA se hallaron motivos bien conservados, en especial la región ubicada entre los a.a 320-410 en el *VSR specific domain* en BP- 80, la cual presentó alta identidad con regiones encontradas en proteobacterias, plantas, levaduras y mamíferos. Podría tenerse en cuenta dicha región como sitio de unión a ligandos no específico para NPIRs, probablemente este sitio ha conferido la capacidad de unión a diferentes clases VDSs, siendo esto un punto clave para el paso del dominio a diferentes clases de organismos a través del tiempo.

6.2 RELACIONES ESTRUCTURALES, FUNCIONALES Y EVOLUTIVAS DEL *VSR SPECIFIC DOMAIN*

La deferencia entre la evolución de organismos y la evolución de proteínas, se basa en que el modelo corriente de evolución de organismos tiene el absoluto requerimiento de la reproducción de estos mismo; así los organismos actuales finalmente provienen de un antepasado común. Sin embargo, la evolución de proteínas no necesita seguir el camino evolutivo de la reproducción como los organismos; mas bien la evolución de proteínas está directamente relacionada con el mejoramiento, inalterado o diversificado de las funciones moleculares y la función de las proteínas esta directamente relacionada a su estructura. Además las estructuras proteicas son mejor conservadas que las secuencias en la evolución, por lo tanto las secuencias en una familia en particular tendrían estructuras moleculares similares o relacionadas.

El efecto de la mutación sobre la función de una proteína se da en relación a los cambios que se produzcan en la naturaleza química de los aminoácidos. La mutación ha permitido el cambio evolutivo de estos dominios a partir de una secuencia ancestral, cambiando las secuencias en mayor o menor medida, pero conservando la naturaleza de los aminoácidos, en muchos casos las secuencias primarias no son idénticas pero si cuentan con aminoácidos de naturaleza hidrofóbica situados específicamente, conservando la estructura secundaria de los dominios estudiados, por lo tanto, se puede decir que su función principal en la proteína no sería alterada; en el caso de los dominios VPS10p y el *VSR specific domain*, presentaron regiones con motivos bien conservados que posiblemente cumplan la función de unión a ligandos, además de la preservación de otras características como la presencia de dominios YXXØ, el requerimiento de CCVs para realizar el *sorting*, y la preservación de cortas regiones ricas en cisteínas. Teniendo en cuenta todo lo anterior, además de las identidades obtenidas entre el *VSR specific domain* y los dominios Vps10p de la sortilina y levadura, teniendo en cuenta que estos resultados son predictivos y no definitivos, se plantea la posibilidad de clasificar al *VSR specific domain* como un dominio VPs10p vegetal.

La secuencia de AtELP1 ha sido comparada con otras proteínas ricas en cisteína: la subunidad 1 y 5 de la β -integrina humana, el receptor EGF humano, los receptores LDL y el dominio Vps10 del receptor de la carboxipeptidasa Y de levaduras, Tamkun *et al.*, (1986) proponen que existe mayor similitud molecular entre los dominios ricos en cisteína (EGFs) de la AtELP1 y las subunidades de la β -integrina considerando entonces, las AtELPs, más cercanas a las β -integrinas, que a los LDL, los receptores EGF y el Vps10 de levaduras (Laval *et al.*, 1999).

Basados en la información estructural y funcional de los receptores LDL y los receptores pertenecientes a la familia Vps10p-D y en las identidades compartidas entre los dominio *VSR specific domain* de BP-80, Vps10p y las regiones *β -propeller* de los receptores LDL, se podría sugerir a los VSRs como ortólogos de las proteínas de la familia Vps10p-D y los receptores LDL, pues cumplen funciones similares, son receptores de proteínas transportadas en vesículas cubiertas de clatrina hacia compartimentos de carácter lítico, presentan regiones ricas en cisteína y como se observó en los resultados antes expuestos, conservan características comunes en su estructura secundaria (Fitch, 1970; Fitch, 2000).

7. CONCLUSIONES

- *VSR specific domain* está presente en el proteoma de todas las plantas.
- Se encontraron secuencias homólogas con identidades mayores a 38% en protistas.
- La identidad HCA, la conservación en número y forma de los agregados hidrofóbicos entre *VSR specific domain*, los β -propeller (LDLRs) y los dominios Vps10p, sugieren que estos dominios podrían provenir de un polipéptido ancestral común.
- *VSR specific domain* podría clasificarse como un dominioVps10p.
- La identidad HCA entre *VSR specific domain* , los dominios Vps10p y los β -propeller (LDLRs)y la conservación en número y forma de los agregados hidrofóbicos sugieren que los VSRs, LDLRs y los receptores Vps10p, están relacionados funcionalmente (receptores) estructuralmente y probablemente evolutivamente.
- La conservación en número y forma de los agregados hidrofóbicos sugieren que los a.a. 163-411 en el dominio central de la BP-80, podrían adoptar una conformación en β -propeller.
- Secuencias bacterianas homólogas sugieren un origen procariota del polipéptido ancestral de las proteínas analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmed S., Bar-Peled M., and Raikhel N., 1997). Cloning and subcellular location of an *Arabidopsis* receptor-like protein that shares common features with protein-sorting receptors of eukaryotic cells. *Plant Physiol.* Vol : 114.

Ahmed S., Rojo E., Kovaleva V., Venkataraman S., Dombrowski J., Matsuoka K., Raikhel N., 2000. The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH₂-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Biology.* Vol:149

Altschul S., Madden T., chaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D., 1997. Gapped BLASTand PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* Vol: 25

Batley N., James N., Greenland A., Brownlee C., 1999. Exocytosis and endocytosis. *Plant Cell.* Vol: 11

Becke B. & Hoef-Emden K., 2009. Evolution of vacuolar targeting in algae. *Botanica Marina.* Vol: 52

Bednarek S. & Raikhel N., 1991. The barley lectin carboxy-terminal propeptide is a vacuolar protein sorting determinant in plants. *Plant Cell.* vol:3

Boller T. & Kende H., 1979. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol.* Vol: 63

Boller T. & Wiemken A., 1987. Dynamics of vacuolar compartmentation. *Annu Rev Plant Physiol.* Vol: 37

Callebaut I., Labesse G., Durand P., Poupon A., Canard L., Chomilier J., Henrissat B. and Mornon J. P., 1997. Deciphering protein sequence information

through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences. Vol: 53

Cao X., Rogers S., Butler J., Beevers L., Rogers J., 2000. Structural requirements for ligand binding by a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell*. Vol: 12

Carter C., Pan S., Zouhar J., Avila E., Girke Th., Raikhel N., 2004. The Vegetative Vacuole Proteome of *Arabidopsis thaliana* Reveals Predicted and Unexpected Proteins. *The Plant Cell*. Vol.: 16

Conticello SG., Kowalsman N., Jacobsen C., Yudkovsky G., Sato K., Elazar Z., Petersen C., Aronheim A., Fainzilber M., 2003. The prodomain of a secreted hydrophobic mini-protein facilitates its export from the endoplasmic reticulum by hitchhiking on sorting receptors. *J Biol Chem*. Vol: 278.

Costaguta G., Stefan C., Bensen E., Emr S., Payne G., 2001. "Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport". *Mol. Biol. Cell* . vol:12

Cuervo A. & Dice J., 1998. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J. Mol. Med*. Vol:76

Culianez-Macia F. & Martin C., 1993. "DIP: a member of the MIP family of membrane proteins that is expressed in mature seeds and Dark-Grown seedlings of *Antirrhinum majus*". *Plant J*. Vol:4

De Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G., Franchisse J., Thomine S., Gambale F., Barbier-Brygoo H., 2006. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*. Vol: 442

Deloche O., Yeung B., Payne G., Schekman R., 2001. Vps10p transport from the trans-Golgi network to the endosome is mediated by clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell*. Vol: 12

Dell'Angelica E., Mullins C., Caplan S., Bonifacino J., 2000. "Lysosome-related organelles." *FASEB J*. Vol:14(10).

Di Sansebastiano G., Paris N., Marc-Martin S., Neuhaus J., 1998. "Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway". *Plant J*. Vol:15(4)

Dupree P. & Sherrier D., 1998. The plant Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Acta* Vol:1404

Fitch W., 1970. Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst. Zool*. Vol:19

Fitch W., 2000. Homology a personal view on some of the problems. *Trends Genet*. Vol:16

Ford MG., Pearse B., Higgins M., Vallis Y., Owen D., Gibson A., Hopkins C., Evans P., McMahon H., 2001. "Simultaneous binding of P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes". *Science* vol:291 (5506)

Ford MG., Mills I., Peter B., Vallis Y., Praefcke G., Evans P., McMahon H., 2002. "Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin". *Nature*. Vol: 419 (6905)

Fotin A., Cheng Y., Sliz P., Grigorieff N., Harrison SC., Kirchhausen T., Walz T., 2004. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* . Vol: 432

Fung K., Yim Y., Tse Y., Miao Y., Sun S., Jiang L., 2005. Targeting and processing of membrane-anchored YFP fusion proteins to protein storage vacuole in transgenic tobacco seeds. *Seed Science Research*. Vol: 15

Gaboriaud C., Bissery V., Benchetrit T., Mornon J., 1987. Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequence. *FEBS Letters*. Vol : 244

Geisler M., Frangne N., Gomes E., Martinoia E., Palmgren M., 2000. The ACA4 gene of *Arabidopsis* encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast¹. *Plant Physiol*. Vol: 124

Ghosh P., Dahms N., Kornfeld S., 2003. "Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol: 4(3)

Hampe W., Urny J., Franke I., Hoffmeister-Ullerich SA., Herrmann D., Petersen CM.,

Lohmann J., Schaller HC., 1999. A head-activator binding protein is present in hydra

in a soluble and a membrane-anchored form. *Development* . Vol:126

Hampe W., Rezgaoui M., Hermans-Borgmeyer I., Schaller H., 2001. The genes for the human VPS10 domain-containing receptors are large and contain many small exons. *Hum. Genet*. Vol:108

Herman E., 1994. Multiple origins of intravacuolar protein accumulation of plant cells. In *Advances in Structural Biology 3*, S. Malhotra, ed (Greenwich, CT: JAI Press Inc.)

Herman E., 1994. Multiple origins of intravacuolar protein accumulation of plant cells. In *Advances in Structural Biology* 3, S.Malhotra, ed (Greenwich, CT: JAI Press Inc.),

Hermey G., Riedel I., Hampe W., Schaller H., Hermans-Borgmeyer I., 1999. Identification and characterization of SorCS, a third member of a novel receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* . Vol:266

Hinz G., Hillmer S., Baumer M., Hohl I., 1999. Vacuolar Storage Proteins and the Putative Vacuolar Sorting Receptor BP-80 Exit the Golgi Apparatus of Developing Pea Cotyledons in Different Transport Vesicles .*Plant Cell* .Vol:11

Hirst J., Lui W., Bright N., Totty N., Seaman M., Robinson M., 2000. "A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome." *J. Cell Biol.* Vol:149(1)

Hoh B., Hinz G., Jeong B., Robinson D., 1995."Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development." *J. Cell Sci.* Vol:108(1)

Holtzmann E., 1989. *Lysosomes*. Plenum Press. New York, London. 439pp

Holwerda B., Padgett C., Rogers J., 1992. "Proaleurain Vacuolar Targeting Is Mediated by Short Contiguous Peptide Interactions." *Plant Cell*. Vol: 4(3)

Humair D., Hernandez Felipe D., Neuhaus JM., Paris N., 2001. Demonstration in yeast of the function of BP-80, a putative plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* Vol:13.

Hunziker W., & Geuze H.,1996. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* 18, 379–389

Jacobsen L., Madsen P., Moestrup S., Lund A., Tommerup N., Nykjær A., Sottrup-Jensen L., Gliemann J., Petersen C., 1996. Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the α 2-macroglobulin receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.* Vol: 271

Jacobsen L., Madsen P., Jacobsen C., Nielsen M., Gliemann J., Petersen C., 2001. *J. Biol. Chem.* Vol: 276

Jaquinod M., Villiers F., Kieffer-Jaquinod S., Hugouvieux V., Bruley C., Garin J., Bourguignon J., 2007. A proteomic dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol Cell Proteomics.* Vol: 6

Jauh G.-Y., Fischer A., Grimes H., Ryan C., Rogers J., 1998. "delta -Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol:95(22)

Jauh G.-Y., Phillips T., Rogers J., 1999. "Tonoplast Intrinsic Protein Isoforms as Markers for Vacuolar Functions." *Plant Cell* . Vol:11(10)

Jiang L., Phillips T., Rogers S., Rogers J., 2000. "Biogenesis of the Protein Storage Vacuole Crystalloid." *J. Cell Biol.* Vol: 150(4)

Jiang L., Phillips T., Hamm C., Drozdowicz Y., Rea P., Maeshima M., Rogers S., Rogers J., 2001. "The protein storage vacuole: a unique compound organelle." *J. Cell Biol.* Vol:155(6).

Jiang L. & Rogers JC., 2003. Sorting of lytic enzymes in the plant Golgi apparatus.

Annual Review of Plant Biology . Vol: 9

Jorgensen MU., Emr S., Winther J., 1999. Ligand recognition and domain structure of Vps10p, a vacuolar protein sorting receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* . Vol: 260

Kirchhausen T., 2000. Clathrin. *Annu Rev Biochem.* Vol: 69

Kirsch T., Paris N., Butler J.M., Beevers L., Rogers J., 1994. Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol: 91

Klionsky D., Herman P., Emr S., 1990. The fungal vacuole: Composition, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* Vol: 54

Kornfeld S. & Mellman I., 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* Vol: 5

Lam S., Tse YC., Jiang L., Oliviusson P., Heinzerling O., Robinson D., 2005. Plant prevacuolar compartments and endocytosis. *Plant Cell Monographs* . Vol:1

Laval V., Chabannes M., Carriere M., Canut H., Barre A., Rouge P., Pont-Lezica R., Galaud J-P., 1999 A family of Arabidopsis plasma membrane receptors presenting animal β -integrin domains *Biochimica et Biophysica Acta* . Vol: 1435

Mahon P., & Bateman A., 2000. The PA domain: a protease-associated domain. *Protein Sci.* Vol: 9

Marty F., 1999. Plant Vacuoles. *The Plant Cell.* Vol:11

Masclaux F., Galaud J., Pont-Lezica R., 2005. The riddle of the plant vacuolar sorting receptors. *Protoplasma.* Vol: 226

Matile P., 1975. The lytic compartment of plant cells. Springer. *Cell biology monographs.* Vol: 1

Matsuoka K., Bassham D., Raikhel N., Nakamura K., 1995. Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J. Cell Biol.* Vol:6

Matsuoka, K. & Neuhaus J.-M., 1999. "Cis-elements of protein transport to the plant vacuoles." *J. Exp.Bot.* Vol:50(331)

Mazella J., Zsurger N., Navarro V., Chabry J., Kaghad M., Caput D., Ferrara P., Vita N., Gully D., Maffrand JP., Vincent J.,P 1998. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-proteincoupled receptor. *J Biol Chem.* Vol: 273

Nielsen M., Jacobsen C., Olivecrona G., Gliemann J., & Petersen C., 1999. *J. Biol. Chem.* Vol:274

Nielsen M., Madsen P., Christensen E., Nykjaer A., Gliemann J., Kasper D., Pohlmann R., Petersen C., 2001. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgiendosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *Embo J.* Vol: 20

Miao Y., Yang M., Yee Li K., Kit Suen P., Shao J., Xu Z., Jiang L., 2007. Molecular Characterization of Plant Vacuolar Sorting Receptor (VSR) Proteins. *Functional Plant Science and Biotechnology* . Vol:1(2)

Nakamura K., Matsuoka K., Mukumoto F., Watanabe N., 1993. Processing and transport to the vacuole of a precursor to sweet potato sporamin in transformed tobacco cell line BY-2. *J. Exp. Bot.* Vol: 44

Neuhaus J.M., Pietrzak M., Boller T., 1994. Mutation analysis of the C-terminal vacuolar targeting peptide of tobacco chitinase: Low specificity of the sorting

system, and gradual transition between intracellular retention and secretion into the extracellular space. *Plant J.* Vol:5

Neuhaus J.M. & Rogers J., 1998. Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol. Biol.* Vol: 38

Nytkjær A., Lee R., Teng K., Jansen P., Madsen P., Nielsen M., Jacobsen C., Kliemann M., Schwarz E., Willnow T., Hempstead B., Petersen C., 2004. *Nature.* Vol: 427

Ohno H., Stewart J., Fournier MC., Bosshart H., Rhee I., Miyatake S., Saito T., Gallusser A., Kirchhausen T., Bonifacino JS., 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science.* Vol: 269

Ohkuma S., & Poole B., 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol: 75

Okita T., & Rogers J., 1996. "Compartmentation of Proteins in the Endomembrane System of Plant Cells." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* Vol:47

Oliviusson P., Heinzerling O., Hillmer S., Hinz G., Tse YC., Jiang L., Robinson DG., 2006. Plant retromer, localized to the prevacuolar compartment and microvesicles in *Arabidopsis*, may interact with vacuolar sorting receptors. *Plant Cell.* Vol:18

Otegui M., Herder R., Schulze J., Jung R., Staehelin L., 2006. The proteolytic processing of seed storage proteins in *Arabidopsis* embryo cells starts in the multivesicular bodies. *Plant Cell.* Vol: 18

Paiardini A. & Caputo V., 2008. Insights into the interaction of sortilin with proneurotrophins: a computational approach. *Neuropeptides*. Vol:42

Paris N. & Neuhaus J.M., 2002. BP-80 as a vacuolar sorting receptor. *Plant Mol. Biol.* Vol 50

Paris N., Stanley CM., Jones RL., Rogers JC., 1996. Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell*. Vol:85

Paris N., Rogers S.W., Jiang L., Kirsch T., Beevers L., Phillips T.E., Rogers J.C. 1997. Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Physiol.* Vol:11.

Park M., Kim S., Vitale A., Hwang I., 2004. "Identification of the Protein Storage Vacuole and Protein Targeting to the Vacuole in Leaf Cells of Three Plant Species." *Plant Physiol.* Vol:134(2)

Park M., Lee D., Lee G., Hwang I., 2005. "AtRMR1 functions as a cargo receptor for protein trafficking to the protein storage vacuole." *J. Cell Biol.* Vol:170

Park J.H., Oufattole M., Rogers J., 2007. Golgi-mediated vacuolar sorting in plant cells: RMR proteins are sorting receptors for the protein aggregation/membrane internalization pathway. *Plant Sci.* Vol:172.

Pearse, B.M.F.,1976. "Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . Vol:73

Petersen CM., Nielsen MS., Nykjaer A., Jacobsen L., Tommerup N., Rasmussen HH., Roigaard H., Gliemann J., Madsen P., Moestrup SK., 1997. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from

human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. J Biol Chem. Vol: 272

Quistgaard EM., Madsen P., Groftehaug MK., Nissen P., Petersen CM., Thirup SS., 2009. Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. Nat Struct Mol Biol. Vol:16

Rezgaoui M., Hermey G., Riedel IB., Hampe W., Schaller HC., Hermans-Borgmeyer I., 2001. Identification of SorCS2, a novel member of the VPS10 domain containing receptor family, prominently expressed in the developing mouse brain. Mech Dev. Vol: 100

Robinson D., Balusek K., Freundt H., 1989 Legumin antibodies recognize polypeptides in coated vesicles from developing pea cotyledons. Protoplasma. Vol 150

Robinson MS., 2004. Adaptable adaptors for coated vesicles. Trends Cell Biol. Vol: 14

Rudenko G., Henry L., Henderson K., Ichtchenko K., Brown M. S., Goldstein J. L., et al. 2002 Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. Science. Vol: 298

Saalbach G., Jung R., Kunze G., Saalbach I., Alder K., Müntz K. , 1991. Different legumin protein domains act as vacuolar targeting signals. Plant Cell. Vol:3

Sanderfoot A.A., Ahmed S.U., Marty-Mazars D., Rapoport I., Kirchhausen T., Marty F., Raikhel N.V., 1998. A putative vacuolar cargo receptor partially colocalizes with AtPEP12p on a prevacuolar compartment in *Arabidopsis* roots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA . Vol:95

Sanderfoot A.A. & Raikhel N.V., 1999. The specificity of vesicle trafficking: Coat proteins and SNAREs. *Plant Cell* . Vol:11

Shimada T., Fuji K., Tamura K., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I., 2003. Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol: 100

Shimada T., Kuroyanagi M., Nishimura M., Hara-Nishimura I., 1997. A pumpkin 72-kDa membrane protein of precursor-accumulating vesicles has characteristics of a vacuolar sorting receptor. *Plant Cell Physiology* . Vol:38

Schmidt, V. *et al.* 2007. SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1. *J. Biol. Chem.* Vol: 282

Springer T. A., 1998. An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor and extracellular matrix components. *J. Mol. Biol.* Vol:283

Staswick, P.E., 1990. Novel regulation of vegetative storage protein genes. *Plant Cell*. Vol: 2

Swanson S.J., Bethke P.C., Jones R.L., 1998. Barley aleurone cells contain two types of vacuoles: Characterization of lytic organelles by use of fluorescent probes. *Plant Cell* . Vol:10

Tague B.W., Dickenson C.D., Chrispeels M.J., 1990. A short domain of the plant vacuolar protein phytohemagglutinin targets invertase to the yeast vacuole. *Plant Cell*. Vol:2.

Tamkun J.W., DeSimon D.W., Fonda D., Patel R.S., Buck C., Horwitz A.F., Hynes R.O., 1986. *Cell*. Vol: 46

Vitale A. & Galili G., 2001. The endomembrane system and the problem of protein sorting. *Plant Physiol.* Vol:125

Vitale A. & Raikhel NV., 1999. What do proteins need to reach different vacuoles?

Trends in Plant Science. Vol: 4

Westergaard B., Sørensen S., Hermey G., Nielsen S., Nykjær A., Kirkegaard K., Jacobsen C., Gliemann J., Madsen P., Petersen C.M., 2004. Functional Organization of the Sortilin Vps10p Domain. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* .Vol. 279

Yamazaki H. *et al.*1996. Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J. Biol. Chem.* Vol: 271

Wakeham DE., Chen CY., Greene B., Hwang PK., Brodsky FM., 2003. "Clathrin self-assembly involves coordinated weak interactions favorable for cellular regulation". *EMBO J.* Vol:22

Wendland B., 2002. Epsins. adaptors in endocytosis? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* .Vol:3

Willnow T., Petersen C., Nykjaer A., 2008. VPS10P-domain receptors — regulators of neuronal viability and function. *NATuRe ReVleWS | neuroscience* Vol: 9

ANEXOS

VSR specific domain (a. a. 143-411)
BP 80
Pisum sativum
P93484.1

Identidad:38%

Phaeodactylum tricornutum
XP 002182623.1

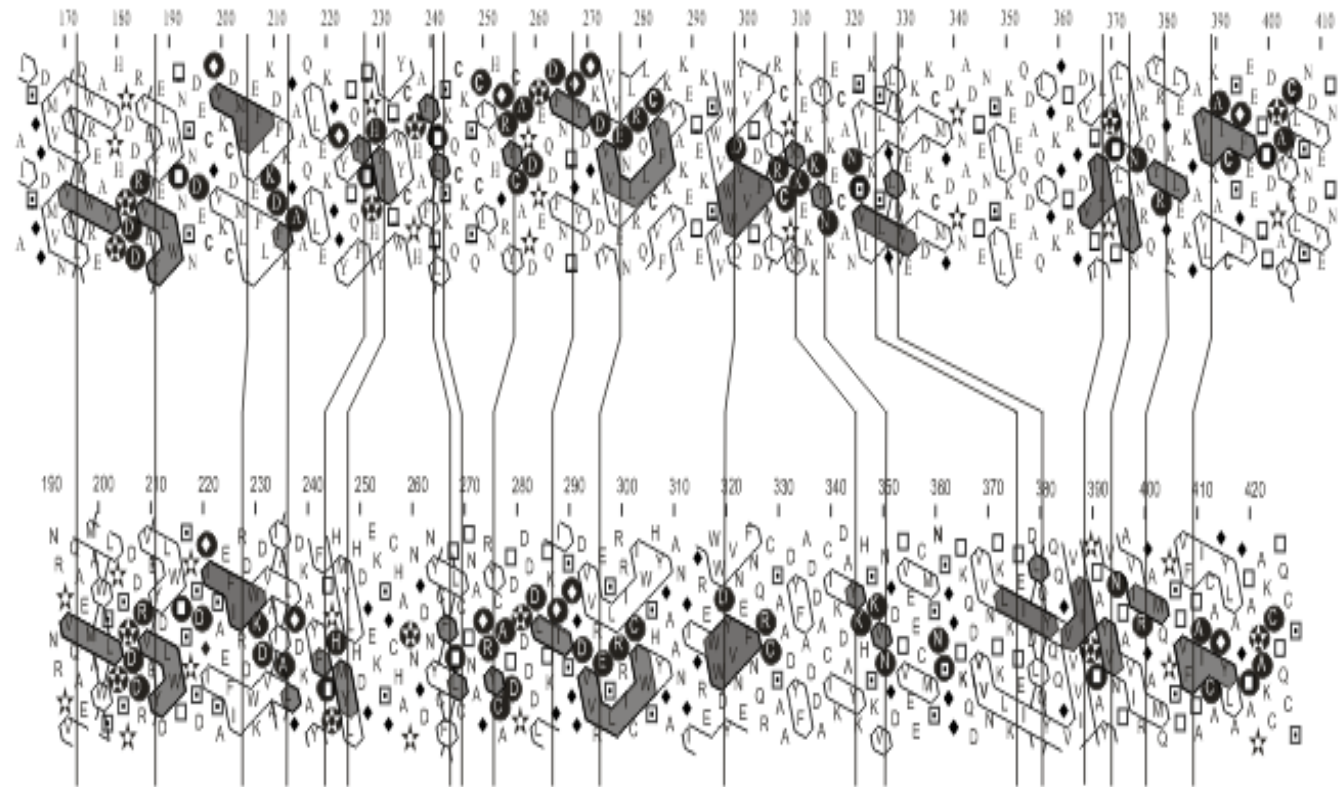


Fig.12: HCA entre una secuencia proteica proveniente de *Phaeodactylum tricornutum* y el VSR specific domain (*pisum sativum*).

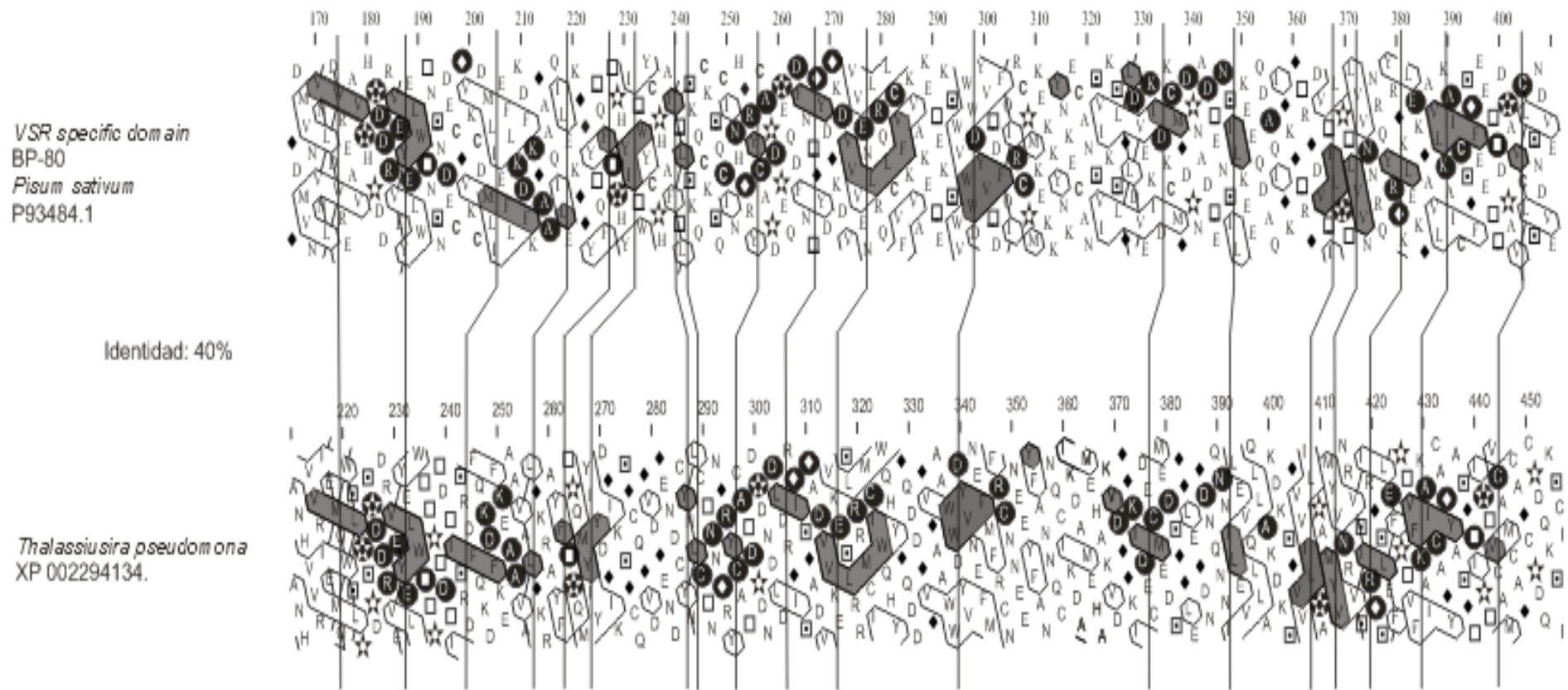


Fig.13: Alineamiento HCA entre el VSR specific domain de la BP 80 (*Pisum sativum*) y la secuencia XP 002294134 (*Thalassiusira pseudonana*).

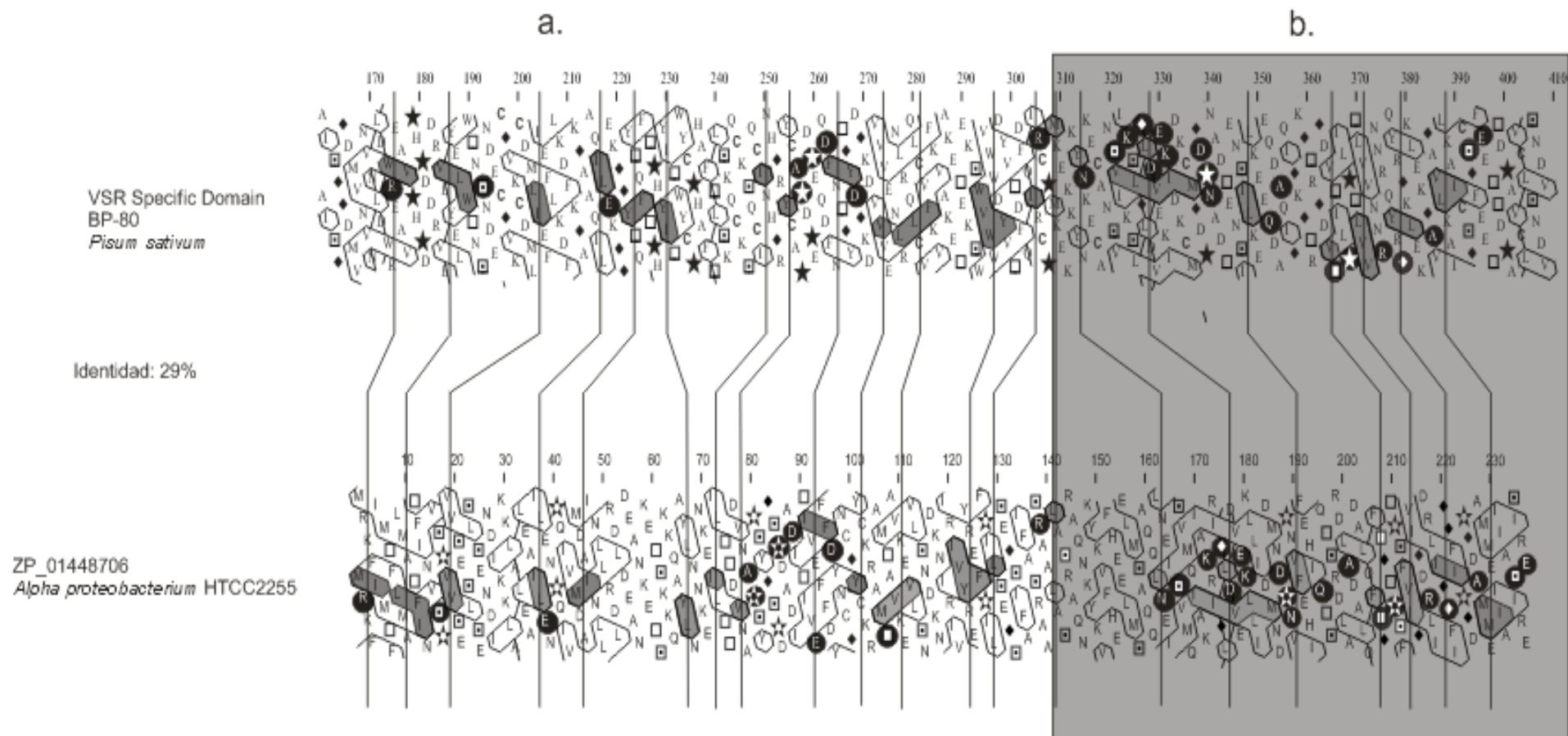


Fig.14: **a.** HCA entre proteína externa de membrana de la Alfa proteobacteria HTCC12255 y el *VSR specific domain*. **b.** alineamiento entre un segmento de la proteína bacteriana y otro del *VSR specific domain*.

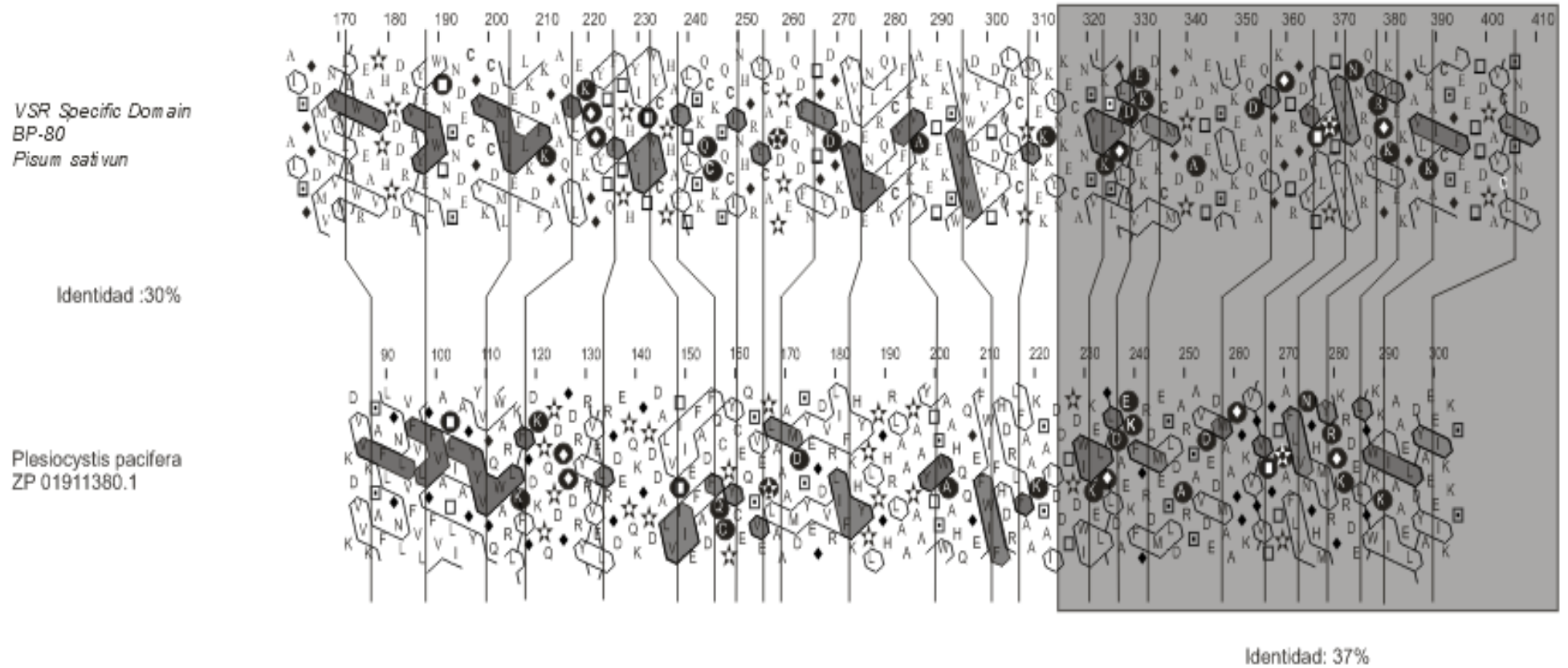
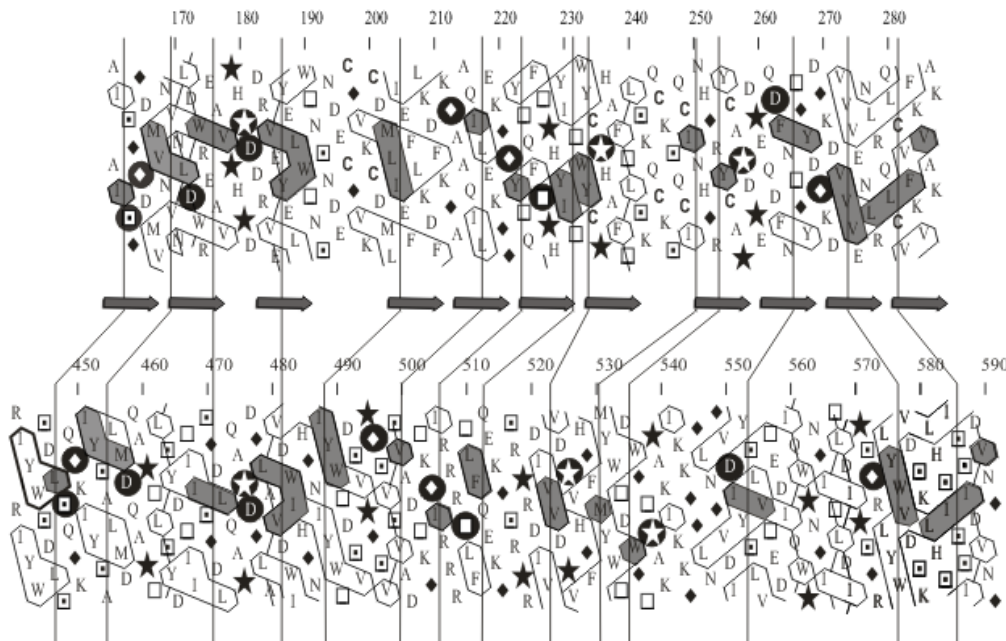


Fig.15: alineamiento HCA entre el *VSR specific domain* y una secuencia proteica de la proteobacteria *Plesiocystis pacifera*.

VSR Specific Domain
BP-80
P93484

Identidad: 28%



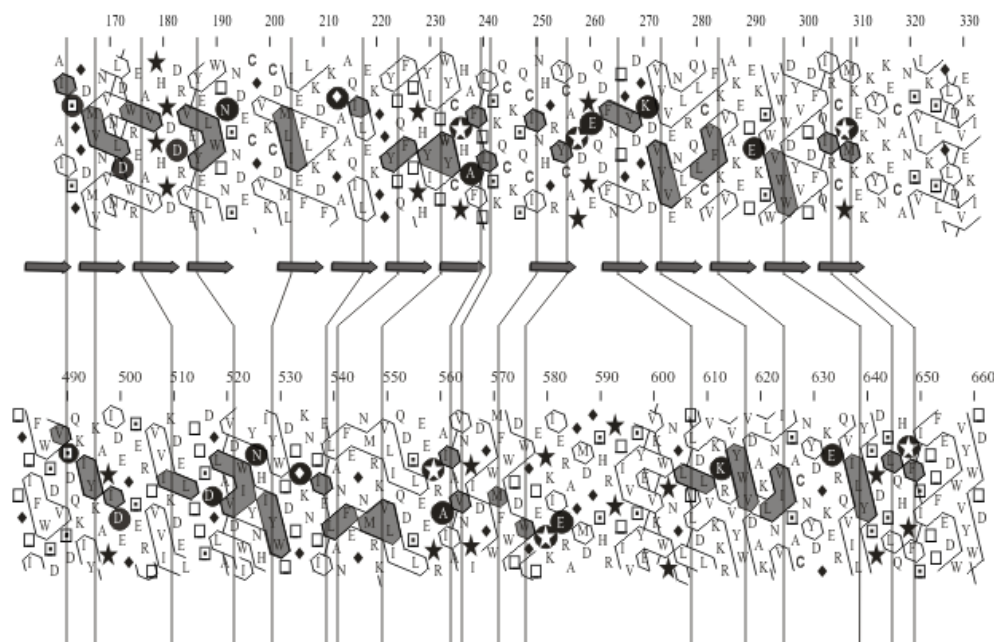
AAA51449
Receptor LDL

Fig.16: Analisis de *clusters* hidrofobicos entre: a. la secuencia del *VSR especific domain* y el receptor LDL presente en *Cricetulus griseus* (AAA51449). b. la secuencia del *VSR especific domain* y el receptor de lipoproteínas (*Leucophaea madera*) (BAE00010).

VSR Specific Domain
BP-80
P93484

Identidad: 28%

BAE0010
Receptor de Lipoproteinas
duplicación LDL



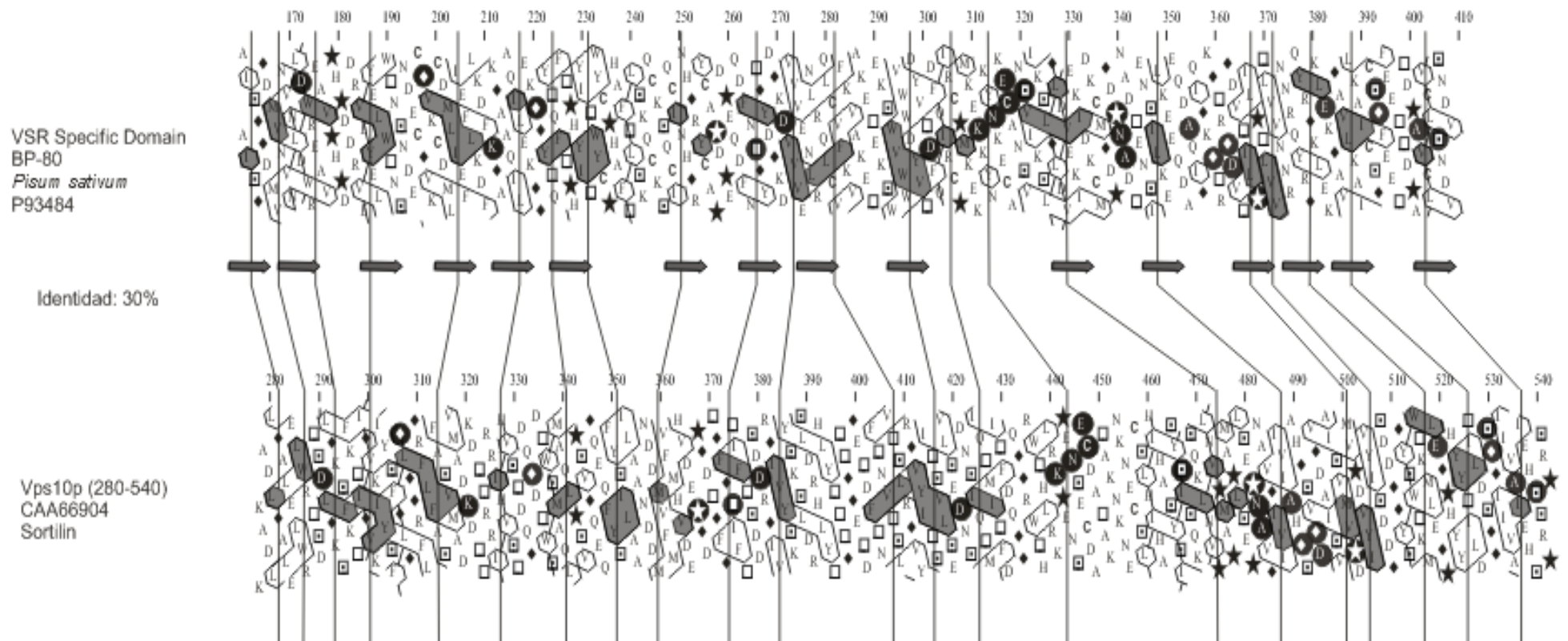


Fig.17: Análisis de agregados hidrofóbicos entre el *Vsr specific domain* (*Pisum sativum*) y la secuencia del dominio Vps10p (a.a. 275-545) de sortilina (*Homo sapiens sapiens*) (CAA66904).

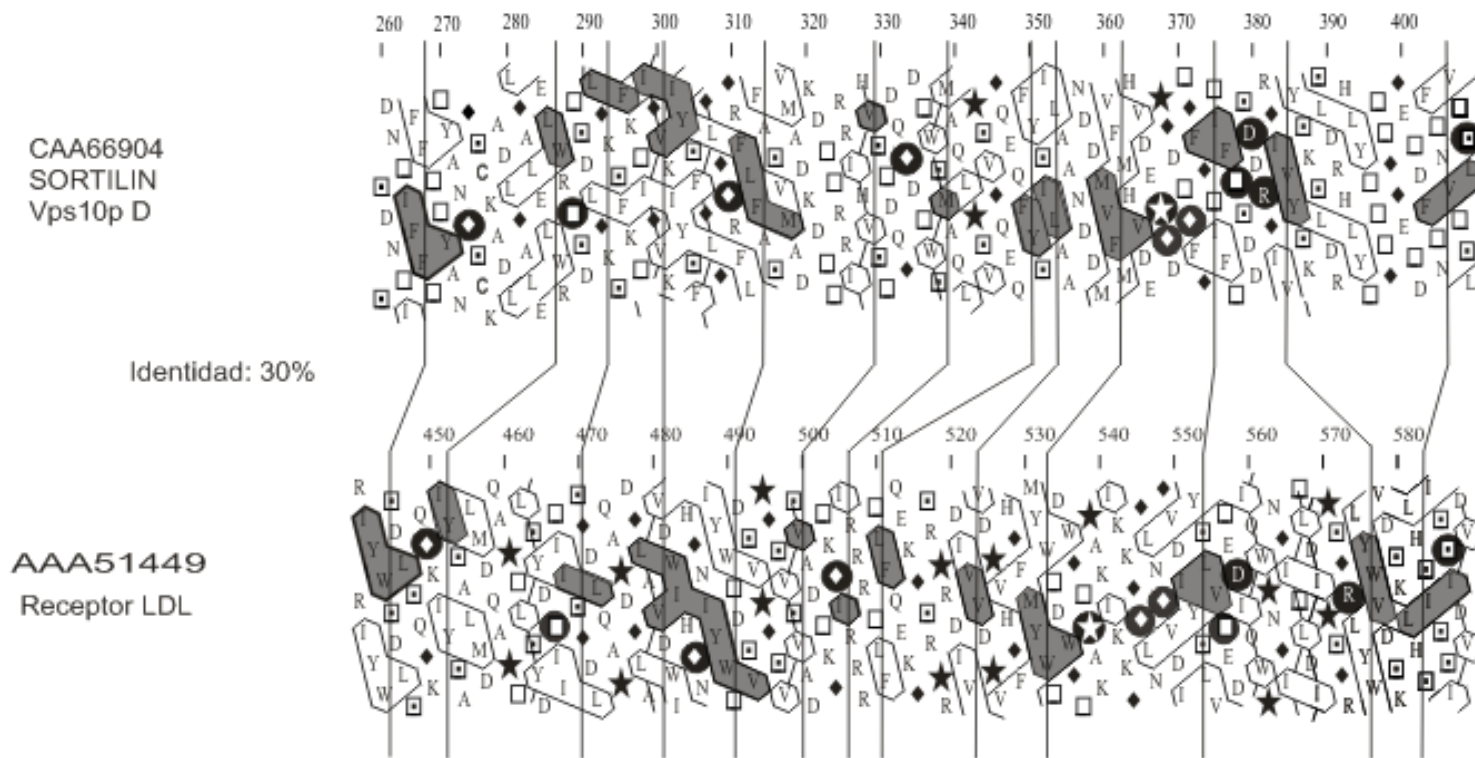


Fig.18: Análisis de agregados hidrofóbicos, entre la región β -propeller del receptor LDL presente en *Cricetulus griseus* (AAA51449) y el dominio Vps10p de la sortilina.

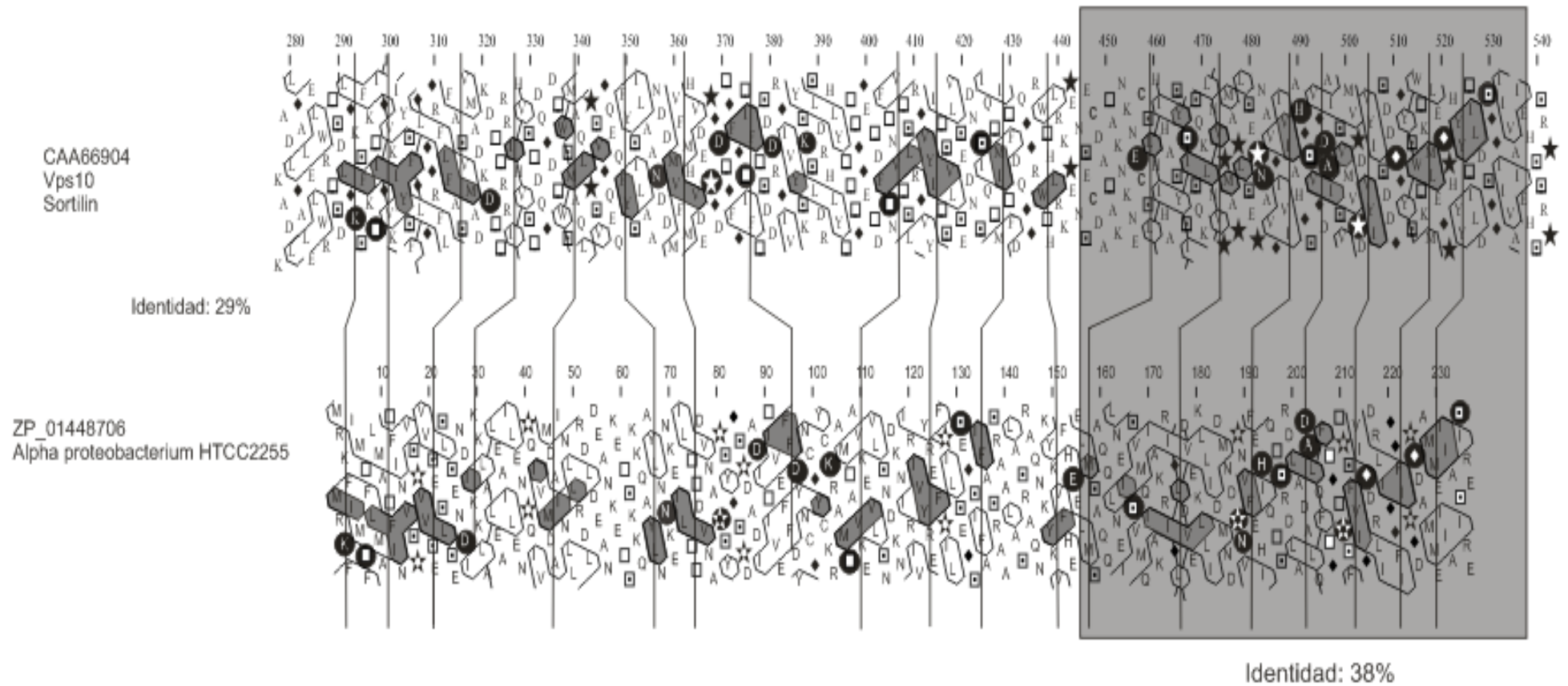


Fig.19: Alineamiento HCA entre el dominio Vps10p de la sortilina y la proteína ZP_01448706 de *Alpha proteobacterium* HTCC2255.

a.

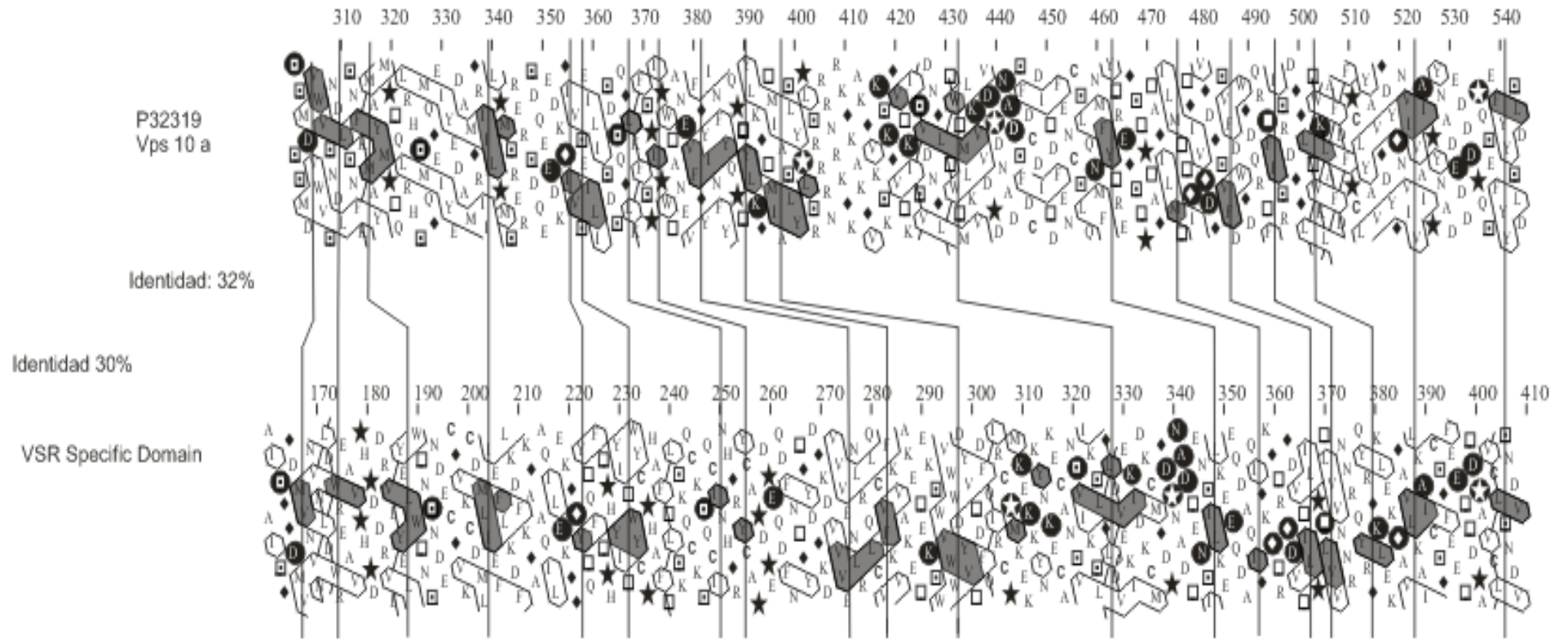


Fig.20: Alineamiento HCA entre el primer dominio Vps10p (a.a 45-728) de *Saccharomyces cerevisiae* y el VSR sepcific domain (*Pisum sativum*).

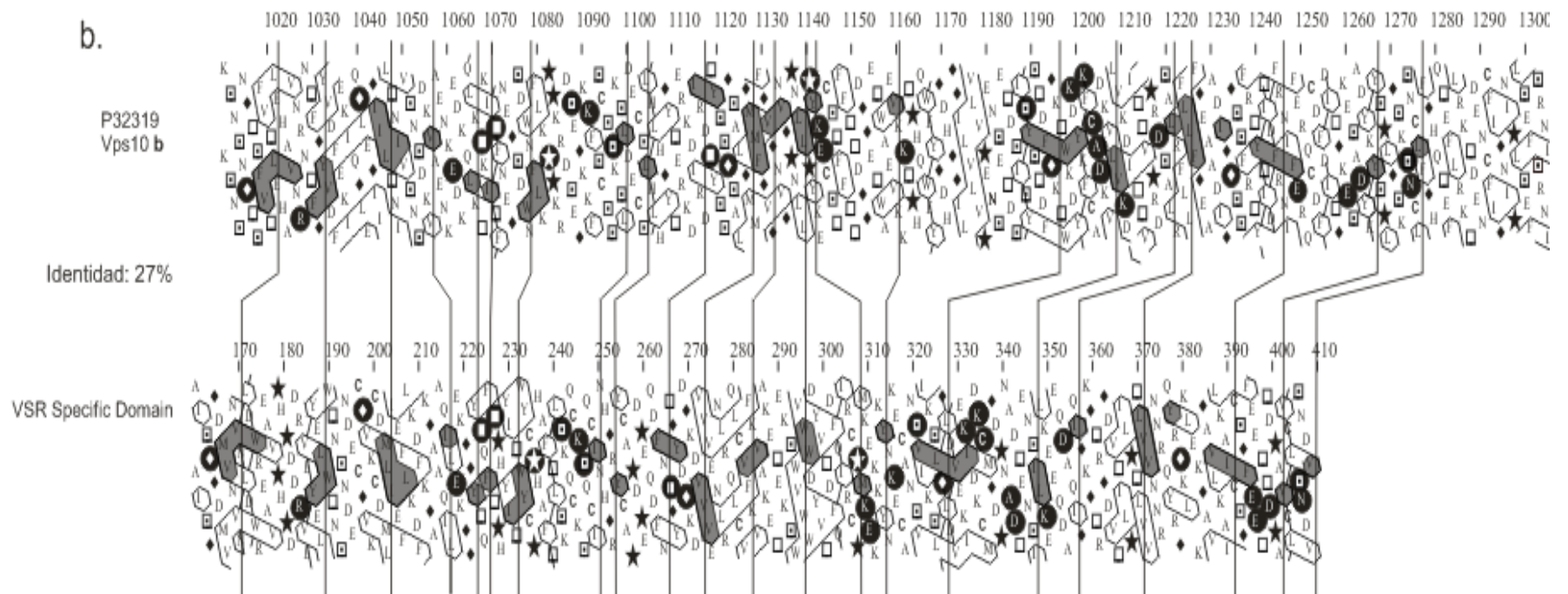


Fig.21: Alineamiento HCA entre el segundo dominio Vps10p (a.a 752-1383) de *Saccharomyces cerevisiae* y el VSR *sepcific domain* (*Pisum sativum*).