

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE ÁCIDOS NUCLEICOS Y PROTEINAS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C POR ESPECTROSCOPIA FTIR

P. Carmona¹, y M. Molina²

¹*Departamento de Espectroscopia vibracional y procesos multifotónicos, CSIC, Serrano 121 28006
Madrid, SPAIN, e-mail:p.carmona@iem.cfmac.csic.es*

²*Departamento de Química Orgánica I, UCM, Arcos de Jálón, 28037 Madrid, SPAIN*

El virus de la hepatitis C (HCV) constituye un problema de salud pública, ya que alrededor del dos por ciento de la población mundial se encuentra afectada por él. Además, los portadores de este virus pueden llegar a padecer enfermedades tales como la cirrosis o carcinoma hepatocelular. Se han realizado estudios para caracterizar proteínas estructurales, tales como la proteína de la nucleocápsida del virus que por estudios *in vitro* se sabe que está directamente relacionada con el ensamblaje viral. Además, su unión con ácidos nucleicos u otras proteínas da lugar a estructuras estables de morfología esférica. Sin embargo, las interacciones específicas entre la proteína "core" y el RNA del virus así como el proceso de ensamblaje en la nucleocápsida no se conocen aún con detalle.

La espectroscopia FTIR es una herramienta que permite estudiar componentes virales, así como sus sistemas precursores. En particular, la espectroscopia de correlación bidimensional (2DCOS) da información sobre la estructura y dinámica de los ácidos nucleicos y proteínas así como de la interacción entre ellos. El análisis de correlación bidimensional determina el orden de eventos durante una perturbación¹, que puede ser un intercambio isotópico.

En este trabajo se caracterizan fragmentos de la proteína y de ácido nucleico así como sus cambios estructurales al interactuar entre ellos; es decir, se definen los estados anterior y posterior al ensamblaje.

Se ha sintetizado la secuencia integrada por los 31 nucleótidos que constituyen el bucle III_d del genoma viral: 5'-UAGCCGAGUAGUGUUGGGUCGCGAAAGGCUU-3'. La proteína recombinante "core" (HCVc-120) fue adquirida de Milan Analytica AG. Asimismo se realizó la reacción del ensamblaje y las estructuras que se formaron fueron observadas por microscopía electrónica (Zeiss 910). Los espectros infrarrojos se obtuvieron con un FTIR Perkin-Elmer 1725X para muestras en disolución tampón y pH adecuados. El análisis de correlación bidimensional se realizó para espectros resultantes de intercambio isotópico H/D y para ello se empleó el programa 2D-Pocha (Kwansei-Gakuin University, Japón). Este análisis permite la correlación de fluctuaciones dinámicas de bandas infrarrojas en una serie de espectros medidos a diferentes tiempos.

Los espectros FTIR de los fragmentos aislados de la proteína HCVc-120 y de los 31-nucleótidos del RNA así como de las partículas nucleocápsidas (NLPs) que forman estas biomoléculas al interactuar muestran que: a) la estructura predominante de la proteína original es desordenada aunque sin embargo cambia a estructura- β cuando ésta se encuentra unida al ácido nucleico; esto se observa en los espectros de segunda derivada en los que aparece un aumento de la intensidad de las bandas a 1635 y 1690 cm^{-1} ; b) las bandas localizadas hacia 1500 cm^{-1} características del azúcar indican que la ribosa mantiene una conformación C3'-*endo*, que junto con la banda a 1235 cm^{-1} asignada a la vibración de tensión antisimétrica del PO_2^- indica la forma A en el RNA;

c) el desplazamiento hacia las bajas frecuencias de la banda de tensión simétrica del fosfoéster (1080 cm^{-1}) en el oligonucleótido, cuando está unido a la proteína, revela una interacción directa con aminoácidos ricos en carga positiva tales como arginina o lisina.

Se han realizado estudios cinéticos registrándose espectros de la nucleocápsida en función del tiempo de deuteración (de 0 a 150 minutos). En las etapas finales de la deuteración se observa que la banda amida A ($\sim 3200\text{ cm}^{-1}$) presenta una semianchura relativamente pequeña ($\sim 90\text{ cm}^{-1}$). Este resultado es consistente con la presencia de estructura- β en el complejo. El intercambio isotópico se cuantifica por reacciones de primer orden e indica que existen tres clases de protones amida relacionados con el tiempo de intercambio: a) protones de intercambio rápido ($5.1 \pm 0.3\text{ min}$), que se encuentran situados sobre la superficie de la proteína; b) protones amida de intercambio isotópico medio ($36.6 \pm 4\text{ min}$), que se sitúan en las regiones flexibles del polipéptido; y c) aquellos que se intercambian lentamente ($108.0 \pm 8\text{ min}$) y se sitúan en el núcleo de la proteína o formando parte de estructura ordenada helicoidal o β .

Con el objeto de estudiar con detalle ciertas interacciones ácido nucleico-proteína se ha realizado un análisis por espectroscopia de correlación bidimensional. Los espectros síncronos (Fig. 1 a) de las regiones $1750\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ y $1150\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ para los intervalos de tiempo 0 a 10 min. muestran que las bandas próximas a 1598 y 1620 cm^{-1} presentan una correlación positiva y negativa (bandas cruzadas claras y oscuras) con la banda a 1678 cm^{-1} , que puede atribuirse a la deuteración de la adenina y citosina en este intervalo de tiempo. Asimismo la deuteración del esqueleto ribosa-fosfato también transcurre en este intervalo de tiempo. La figura 1 b muestra los espectros síncronos de las partículas nucleocápsidas obtenidos en el intervalo de tiempo entre 10 a 90 min., en los que se advierte una clara correlación positiva entre las bandas de guanina a 1580 cm^{-1} y arginina a 1603 cm^{-1} , lo que sugiere contactos RNA-proteína a través de enlaces de hidrógeno guanina-arginina².

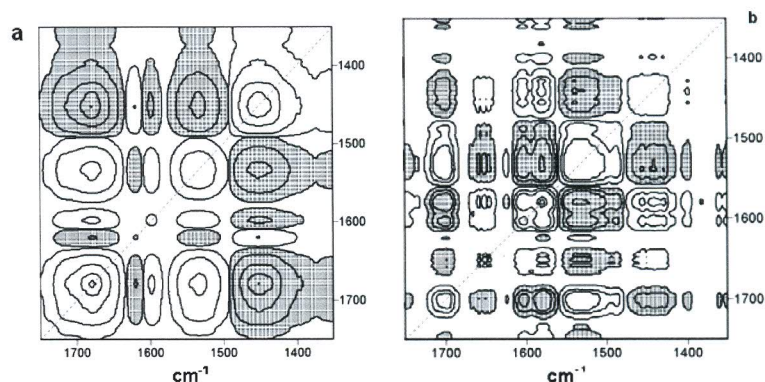


Figura 1. Espectros síncronos de la NLPs para el intercambio H/D a tiempos a) 0-10 min. b) 10-90 min.

1. I. Noda and Y. Ozaki. Applications in vibrational and optical spectroscopy, p, 15 Wiley Chichester (2004).
2. P. Carmona and M. Molina. *Biochemistry* **49**, 4724-4731 (2010).

Agradecimientos. Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación del gobierno español la financiación para este proyecto (CTQ2009-09538).