



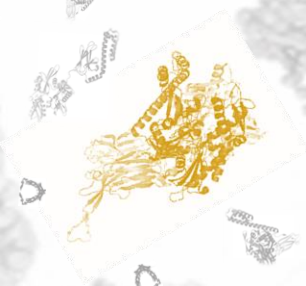
Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD CHAPERONA DE Hsc70 HUMANA POR Apg2: PAPEL DE LOS DOMINIOS DIVERGENTES

Yovana Cabrera Hernández

Tesis Doctoral
Leioa 2021





Instituto
Biofisika
Institutua



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

Tesis Doctoral

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD CHAPERONA DE HSC70 HUMANA POR APG2: PAPEL DE LOS DOMINIOS DIVERGENTES

YOVANA CABRERA HERNÁNDEZ

Directores

Fernando Moro Pérez

Arturo Muga Villate

Instituto Biofisika

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencia y Tecnología

Leioa 2021

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la beca FPI (Formación de Personal Investigador) de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea y a los contratos pre-doctorales del Instituto de Biofisika.

En primer lugar, me gustaría agradecer a todas esas personas que han compartido mi día a día dentro del labo durante todos estos años.

A Arturo, por darme la oportunidad de trabajar en tu equipo, por todo lo que me has enseñado y por haber apostado por mí en todo momento. A Fernan, por tu disponibilidad, por todos tus consejos y en especial, por la ayuda que me has prestado en esta última etapa de escritura. Gracias.

A mis compañeros. A *los de ciencias* y a *los chaperones*. Por todos los buenos ratos que me habéis hecho pasar, tanto dentro como fuera del labo. Por los cafés, las comidas, las farras, los findes... Pero también por haber sido un apoyo cuando las cosas se torcían o simplemente era un mal día. Por haber sido una segunda familia todos estos años. Me quedo con lo bueno y os echaré de menos. Gracias.

A mis compañeros de *kotxetxungo*. Por todas las horas de viaje y cafetería compartidas. Porque ser copiloto no mola. Por todas esas conversaciones y risas que me hacían empezar y terminar el día con alegría. Gracias.

Pero estos años he tenido la suerte de poder contar también con muchas otras personas que, ajenas al labo, me han acompañado, apoyado y enseñado tantas cosas que sería injusto no hacerles un hueco en esta memoria, pues también han formado parte de esta etapa de mi vida. Gracias a todos y en especial:

A Pilar, por haber estado ahí en una etapa complicada. Por tus consejos, tiempo y cariño. Gracias.

A Ainhoa, por haberme cuidado y guiado durante estos años. Por ayudarme a conocerme y sentirme orgullosa de quien soy y de lo que he conseguido. Gracias.

A mis hermanos Jose Mari, María y Mikel. Por haber mirado siempre “hacia arriba” con admiración, entendiendo que lo que importa no es de dónde vienes sino a dónde vas. Que nadie os diga quienes sois. Gracias.

A todos los Bodeguilleros, por haberme dado tanta vida estos dos últimos años. A Julito por nuestras conversaciones, a Andre por tu cariño y a Ramun por tus abrazos. Pero en especial a Libe y a Amaia, por haberme dejado formar parte de vuestro equipo. Por cómo me cuidáis y por todo el cariño que me dais. Gracias. Zaindu maite duzun hori.

A mis amigas, por su apoyo y comprensión. Por animarme siempre a seguir adelante. A Ainarita por tus consejos. A Amaia, por tus conversaciones y por haberme apoyado en todo momento. Pero en especial a Maria, compañera ya de vida. Por haberme acompañado también durante esta etapa. Por recordarme tantas veces lo que esto me apasiona y obligarme a seguir en todo momento. Gracias.

Y por último y en este caso el más importante, a Álvaro. Porque los dos sabemos cuánto ha costado llegar hasta aquí y todo lo que se ha quedado por el camino. Gracias por haber sido mi principal apoyo todos estos años. Por cuidarme, quererme y guiarme como lo has hecho. Si hoy estoy escribiendo esto es gracias a ti. Gracias.

*“Haz lo que amas. Ama todo lo que hagas.
Cualquier cosa que hagas, hazla con todo tu corazón”*

A Álvaro

ÍNDICE

i. Abreviaturas y acrónimos	ix
ii. Índice de figuras	xi
iii. Índice de tablas.	xvi
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. PLEGAMIENTO PROTEICO Y AGREGACIÓN	3
1.1.1. Plegamiento proteico	3
1.1.2. Plegamiento <i>in vivo</i> y el sistema de control de calidad	5
1.2. CHAPERONAS MOLECULARES	7
1.2.1. Clasificación de las chaperonas moleculares	8
1.2.1.1. sHsp	10
1.2.1.2. Hsp60	11
1.2.1.3. Hsp90	11
1.2.1.4. Hsp100	13
1.3. CHAPERONAS MOLECULARES Y REACTIVACIÓN DE AGREGADOS PROTEÍCOS	15
1.3.1. Desagregasas en bacterias y levaduras: el sistema bichaperona Hsp100-Hsp70	16
1.3.2. Desagregasas en metazoos: el sistema de Hsp70	18
1.4. LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DESAGREGASA HUMANO BASADO EN EL SISTEMA DE HSP70	20
1.4.1. Hsc70 humana y la familia de chaperonas Hsp70	21

1.4.1.1.- Características generales de la familia Hsp70	22
1.4.1.2.- Dominios funcionales y estructura de Hsp70	23
1.4.1.3.- Diferencias estructurales entre las Hsp70	26
1.4.1.4.- Ciclo conformacional de Hsp70	28
1.4.1.5.- Regulación del ciclo funcional de Hsp70 por cochaperonas	30
1.4.1.6.- Mecanismo de plegamiento de Hsp70	32
1.4.2. DnaJB1 y DnaJA2 humanas y la familia de chaperonas Hsp40	33
1.4.2.1.- Dominios funcionales y estructura de proteínas de la familia Hsp40	34
1.4.2.2.- Interacción con Hsp70	37
1.4.3.- Apg2 humana y la familia de chaperonas Hsp110	38
1.4.3.1.- Estructura de las chaperonas Hsp110	40
1.4.3.2.- Ciclo funcional de Hsp110, hidrólisis de ATP e interacción con sustratos	44
1.4.3.3.- Interacción con Hsp70 e intercambio de nucleótido	45
1.4.3.4.- El papel de Hsp110 en la reactivación de agregados proteicos	48
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1. CULTIVOS CELULARES	55
3.1.1. Cepas bacterianas	55

3.1.2. Medios de cultivo, selección y conservación	56
3.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	56
3.2.1. Extracción de ADN plasmídico.	56
3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	57
3.2.2.1. Mutagénesis dirigida utilizando PCR	59
3.2.3. Digestiones de ADN con enzimas de restricción	61
3.2.4. Ligación	62
3.2.5. Electroforesis de ADN	62
3.2.6. Cuantificación de ADN	62
3.2.7. Transformación por electroporación	63
3.2.8. Transformación por cloruro de calcio	63
3.3. CLONAJE Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	64
3.3.1. Clonaje de las proteínas y de sus mutantes	64
3.3.2. Purificación de las chaperonas	67
3.3.2.1. Características particulares de la purificación de Apg2, Hsc70 y DnaJB1	68
3.3.2.2. Purificación de ULP1	69
3.3.2.3. Otras proteínas y péptidos	69
3.4. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS DE PROTEÍNAS	73
3.4.1. Electroforesis desnaturizante en SDS-PAGE	73
3.4.2. Electroforesis en geles nativos	74
3.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	74

3.5.1. Método Bradford	74
3.5.2. Absorbancia	75
3.5.3. Densitometría	75
3.6. MÉTODOS BIOQUÍMICOS UTILIZADOS PARA DETERMINAR LA CONFORMACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS CHAPERONAS	76
3.6.1. Proteólisis parcial con tripsina	76
3.6.2. Cromatografía de tamizado molecular analítica	76
3.6.3. Actividad ATPasa	77
3.6.4. Protección de la agregación de sustratos proteicos	78
3.6.5. Agregación de sustratos proteicos y reactivación por chaperonas	79
3.6.6. Interacción de chaperonas con agregados de G6PDH	80
3.7. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	81
3.7.1. Anisotropía de fluorescencia: Unión y liberación del péptido FT7	81
3.7.2. Marcaje específico con sondas fluorescentes	84
3.7.3. Medidas de cinética rápida mediante flujo detenido (“Stopped- flow”)	85
3.7.4. Dispersión de luz	86
3.7.5. Dicroísmo circular	87
3.7.5.1. Espectros de Dicroísmo Circular	90
3.7.5.2. Rampas de temperatura	90
3.8. SPR	90

3.9. DIFRACCIÓN DE RAYOS X A BAJO ÁNGULO (SAXS)	93
4. RESULTADOS	97
4.1. REACTIVACIÓN DE AGREGADOS PROTEICOS POR LAS CHAPERONAS HSC70, DNAJB1 Y APG2 HUMANAS	97
4.1.1. Optimización de la concentración de chaperonas moleculares	97
4.1.1.1. Hsc70	98
4.1.1.2. Apg2	99
4.1.1.3. DnaJB1	99
4.1.2. Impacto de las condiciones de agregación de sustratos modelo en el replegamiento <i>in vitro</i> inducido por las chaperonas humanas	100
4.1.2.1. Glucosa 6-fosfato Deshidrogenasa (G6PDH)	100
4.1.2.2. Luciferasa	103
4.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA DE CHAPERONAS HUMANO POR APG2. PAPEL DEL DOMINIO ACÍDICO (AS)	107
4.2.1. Caracterización estructural de Apg2 y Apg2 Δ AS	108
4.2.1.1. Dicroísmo circular	108
4.2.1.2. SAXS	108
4.2.2. Cambios conformacionales de Apg2 y Apg2 Δ AS: efecto de la unión de nucleótidos	112
4.2.2.1. Dicroísmo circular	112
4.2.2.2. Proteólisis	112
4.2.2.3. Cromatografía de tamizado molecular analítica y electroforesis nativa	114
4.2.3. Análisis de los complejos Hsc70:Apg2	116

4.2.3.1. Análisis por SEC de los complejos Hsc70:Apg2	116
4.2.3.2. Determinación de la afinidad de Apg2 por Hsc70 mediante SPR	117
4.2.3.3. Caracterización de los complejos Hsc70:Apg2 por electroforesis nativa	120
4.2.4. Estudios funcionales del sistema de chaperonas humanas Hsc70/DnaJB1/Apg2: papel del AS de Apg2	123
4.2.4.1. Protección de la agregación de sustratos proteicos desnaturalizados	123
4.2.4.2. Replegamiento de agregados proteicos	126
4.2.4.3. Interacción de las chaperonas con sustratos proteicos	129
4.2.4.4. Estudio del ciclo funcional de Hsc70 ligado a su actividad ATPasa: regulación por las cochaperonas de DnaJB1 y Apg2	135
4.3. PAPEL DE LA EXTENSIÓN C-TERMINAL DE APG2 EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA DE CHAPERONAS HUMANO	147
4.3.1. Propiedades estructurales de Apg2 Δ C	149
4.3.1.1. Dicroísmo circular	149
4.3.1.2. SAXS	150
4.3.2. Cambios conformacionales de Apg2 Δ C asociados a la unión de nucleótidos	151
4.3.3. Análisis de los complejos Hsc70: Apg2 Δ C	152
4.3.3.1. Determinación de la afinidad del complejo Hsc70:Apg2 Δ C en ausencia de nucleótidos	153

4.3.3.2. Análisis del complejo Hsc70:Apg2ΔC en presencia de nucleótidos por electroforesis nativa	154
4.3.4. Efecto de la eliminación de la extensión C-terminal de Apg2 en la actividad funcional del sistema de chaperonas humanas	157
4.3.4.1. Protección de la agregación de sustratos proteicos por Apg2ΔC	157
4.3.4.2. Reactivación de agregados de LUC y G6PDH	159
4.3.4.3. Interacción de Hsc70 con agregados de G6PDH en presencia de Apg2ΔC	162
4.3.4.4. Efecto de la extensión C-terminal en la estimulación de la actividad ATPasa de Hsc70	163
4.3.5. Efecto de la extensión C-terminal en el intercambio de nucleótido	164
5. DISCUSIÓN	169
5.1. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD CHAPERONA DE HSC70 POR APG2 Y DNAJB1	170
5.2. FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS AS Y LA EXTENSIÓN C-TERMINAL EN LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS HSC70:APG2	175
5.3. EFECTO DEL AS Y LA EXTENSIÓN C-TERMINAL DE APG2 EN LA ACTIVIDAD CHAPERONA DE HSC70	178
6. CONCLUSIONES	185
7. BIBLIOGRAFÍA	189

i. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- ADP: Adenosín difosfato
- AS: Subdomino ácido de Apg2
- ATP: Adenosín trifosfato
- ATP γ S: Adenosín 5'-O-(3-tio)-trifosfato
- BSA: Seroalbúmina bovina
- CD: Dicroísmo circular
- DMSO: Dimetil sulfóxido
- dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato
- DTT: ditioneitol
- EDTA: Ácido etilendiaminotetracético
- FT7: Péptido sintético de secuencia FYQLALT
- G6PDH: Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa
- HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetanesulfónico
- Hsp: Proteínas de choque térmico
- IC₅₀: Concentración de ligando a la que se da una inhibición del 50% del valor
- IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
- JDP: Proteínas que contienen el dominio J
- K_d: Constante de equilibrio de disociación
- K_{obs}: Constante cinética de unión observada
- k_{off}: Constante de liberación
- k_{on}: Constante de asociación
- LB: Luria Bertani
- LDH: Lactato deshidrogenasa
- LUC: Luciferasa

- MABA-ADP: 8-[(4-amino)butil]-aminoadenosin-5'-difosfato, marcado con la sonda MANT (N-metilntranol)
- NAD⁺: Nicotinamida-Adenina Dinucleotido oxidada
- NADH: Nicotiamida-Adenina Dinucleotido reducida
- NADP⁺: Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato oxidada
- NADPH: Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato reducida
- NBD: Dominio de unión a nucleótido
- NEF: Factor de intercambiador de nucleótido
- NES: señal de exportación nuclear
- NLS: señal de importación nuclear
- OD₆₀₀: Densidad óptica a 600nm
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PEP: Fosfoenol piruvato.
- PK: Piruvato quinasa.
- PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
- rpm: Revoluciones por minuto
- SAXs: Difracción de rayos X de bajo ángulo
- SBD: Dominio de unión a sustrato
- SEC: cromatografía de exclusión molecular
- sHsp: proteína de choque térmico pequeña
- SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
- SPR: Resonancia de Plasmón Superficial.
- TCEP: Tricloroetilfosfato
- T_m: Temperatura de desnaturalización
- UPS: Sistema Ubiquitina-Proteasoma
- β-Me: β- mercaptoetanol

ii. ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.1:</i> Embudos de plegamiento	5
<i>Figura 1.2:</i> El sistema de control de calidad del proteoma	6
<i>Figura 1.3:</i> Estructura cuaternaria de Hsp16.5 de <i>Methanococcus Jannaschii</i>	11
<i>Figura 1.4:</i> Chaperoninas de la familia Hsp60	12
<i>Figura 1.5:</i> Estructura del dímero GRP94-NMC	13
<i>Figura 1.6:</i> Estructura de Hsp104 y ClpB	14
<i>Figura 1.7:</i> Reactivación de agregados en bacterias por el sistema bichaperona ClpB-DnaK	18
<i>Figura 1.8:</i> Reactivación de agregados en metazoos por el sistema de Hsp70.	20
<i>Figura 1.9:</i> Estructura de los dominios de Hsp70	24
<i>Figura 1.10:</i> Diferencias estructurales que afectan al NBD y SBD de Hsp70	27
<i>Figura 1.11:</i> Ciclo conformacional de Hsp70	29
<i>Figura 1.12:</i> Factores de intercambio de nucleótidos de Hsp70	31
<i>Figura 1.13:</i> Proteínas JDP	35
<i>Figura 1.14:</i> Unión del dominio J a Hsp70 en presencia de ATP y Mg ²⁺	38
<i>Figura 1.15:</i> Distribución de dominios y estructura de las chaperonas de la familia Hsp110	41
<i>Figura 1.16:</i> Alineamiento de secuencias de miembros de las familias de chaperonas Hsp70 y Hsp110	43
<i>Figura 1.17:</i> Estructura del complejo Hsp110:Hsp70	46

<i>Figura 1.18:</i> Diferencias estructurales en el NBD de Hsp70 libre o en complejo con Hsp110	47
<i>Figura 3.1:</i> Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	58
<i>Figura 3.2:</i> Esquema del método <i>Quickchange Site Directed Mutagenesis</i>	60
<i>Figura 3.3:</i> Reacción catalizada por la Luciferasa	70
<i>Figura 3.4:</i> Reacción catalizada por la Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa	71
<i>Figura 3.5:</i> Reacción catalizada por la Lactato Deshidrogenasa	71
<i>Figura 3.5:</i> Reacción catalizada por la Lactato Deshidrogenasa	72
<i>Figura 3.7:</i> Estructura molecular del péptido FYQLALT (FT7)	72
<i>Figura 3.8:</i> Cromatografía de tamizado molecular	77
<i>Figura 3.9:</i> Esquema del sistema acoplado regenerador de ATP	78
<i>Figura 3.10:</i> Anisotropía de fluorescencia	83
<i>Figura 3.11:</i> Ejemplo del marcaje de una proteína con una sonda fluorescente en uno de sus grupos amino	84
<i>Figura 3.12:</i> Esquema de un equipo de medida típico de <i>stopped flow</i>	86
<i>Figura 3.13:</i> Dispersión de luz Rayleigh.	87
<i>Figura 3.14:</i> Dicroísmo circular	89
<i>Figura 3.15:</i> Medidas de Resonancia de Plasmón Superficial.	91
<i>Figura 4.1:</i> Reactivación de agregados de G6PDH por el sistema de chaperonas humanas	98
<i>Figura 4.2:</i> Efecto de las concentraciones de agregación y ensayo en el rendimiento de reactivación de agregados de G6PDH por el sistema de chaperonas humanas	101

<i>Figura 4.3:</i> Efecto de la temperatura de agregación de G6PDH en la actividad replegadora del sistema de chaperonas humanas	103
<i>Figura 4.4:</i> Reactivación de agregados de LUC formados tras su desnaturalización en presencia de urea 6 M	104
<i>Figura 4.5:</i> Reactivación de agregados de LUC formados tras su desnaturalización térmica	105
<i>Figura 4.6:</i> El domino AS de Hsp110 humanas	107
<i>Figura 4.7:</i> Caracterización de la estructura secundaria y desnaturalización de Apg2 y el mutante Apg2 Δ AS	109
<i>Figura 4.8:</i> Caracterización estructural de Apg2 silvestre y Apg2 Δ AS mediante SAXS	110
<i>Figura 4.9:</i> Caracterización de la estructura secundaria y desnaturalización de Apg2 y el mutante Apg2 Δ AS en ausencia o en presencia de nucleótidos	113
<i>Figura 4.10:</i> Proteólisis parcial con tripsina de Apg2 y Apg2 Δ AS en ausencia o en presencia de nucleótidos	114
<i>Figura 4.11:</i> Análisis por electroforesis nativa y SEC del estado oligomérico de Apg2 y el mutante Apg2 Δ AS en ausencia o en presencia de nucleótidos	115
<i>Figura 4.12:</i> Análisis de la formación de complejos entre Apg2 y Hsc70 por SEC	117
<i>Figura 4.13:</i> Caracterización de la K_d para la interacción de Hsc70 con Apg2 y el mutante Apg2 Δ AS	119
<i>Figura 4.14:</i> Análisis de la formación de complejos entre Hsc70 y Apg2 o Apg2 Δ AS en presencia de nucleótidos	122

<i>Figura 4.15:</i> Protección de la agregación de luciferasa desnaturalizada térmicamente por Apg2, Apg2 Δ AS y Hsc70	124
<i>Figura 4.16:</i> Reactivación de agregados de LUC y G6PDH por chaperonas humanas	128
<i>Figura 4.17:</i> Interacción de las chaperonas humanas con agregados de G6PDH	131
<i>Figura 4.18:</i> Interacción de Hsc70 con el péptido FT7 y efecto de Apg2 y Apg2 Δ AS en su asociación y disociación	133
<i>Figura 4.19:</i> Actividad ATPasa de diferentes combinaciones de chaperonas humanas y efecto de la fuerza iónica y pH	137
<i>Figura 4.20:</i> Actividad NEF de Apg2 y Apg2 Δ AS	139
<i>Figura 4.21:</i> Actividad ATPasa del sistema de chaperonas humano a concentraciones crecientes de Apg2 y Apg2 Δ AS	140
<i>Figura 4.22:</i> Efecto de los mutantes Apg2-D7S y Hsc70-T204A en la reactivación de agregados de LUC por las chaperonas humanas	141
<i>Figura 4.23:</i> Regulación de la actividad ATPasa del sistema de chaperonas humano por DnaJB1	143
<i>Figura 4.24:</i> Regulación competitiva de la actividad ATPasa del sistema de chaperonas humano por Apg2 y Apg2 Δ AS	145
<i>Figura 4.25:</i> La extensión C-terminal de Hsp110 humanas	148
<i>Figura 4.26:</i> Caracterización de la estructura secundaria y desnaturalización del mutante Apg2 Δ C	149
<i>Figura 4.27:</i> Caracterización estructural de Apg2 Δ C mediante SAXS y comparación con Apg2 silvestre	150
<i>Figura 4.28:</i> Cambios conformacionales de Apg2 Δ C en ausencia o en presencia de nucleótidos	152

<i>Figura 4.29:</i> Caracterización mediante SPR de la K_d del complejo Hsc70:Apg2 Δ C en ausencia de nucleótidos	154
<i>Figura 4.30:</i> Caracterización del complejo Hsc70:Apg2 Δ C y su afinidad en presencia de nucleótidos mediante electroforesis nativa	155
<i>Figura 4.31:</i> Protección de la agregación de luciferasa desnaturalizada térmicamente por Apg2 Δ C	158
<i>Figura 4.32:</i> Reactivación de agregados de LUC y G6PDH por Hsc70 y DnaJB1 en presencia de Apg2 Δ C	161
<i>Figura 4.33:</i> Interacción de las chaperonas humanas con agregados de G6PDH	162
<i>Figura 4.34:</i> Actividad ATPasa del sistema de chaperonas humano a concentraciones crecientes de Apg2 y Apg2 Δ C	163
<i>Figura 4.35:</i> Actividad NEF de Apg2 y Apg2 Δ C	164
<i>Figura 5.1:</i> Regulación de la ATPasa, unión de Hsc70 a los agregados y su plegado por Apg2	171
<i>Figura 5.2:</i> Ciclo ATPasa de Hsc70 y su interacción con agregados proteicos	172
<i>Figura 5.3:</i> Interacciones entre los dominios de Hsc70 y Apg2	181

iii. ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.1:</i> Clasificación de chaperonas moleculares en función de su tamaño molecular	9
<i>Tabla 1.2:</i> Chaperonas involucradas en procesos de solubilización y reactivación de agregados proteicos	16
<i>Tabla 3.1.</i> Cepas derivadas de <i>E. coli</i> empleadas en esta Tesis para la sobreexpresión de proteínas	55
<i>Tabla 3.2.</i> Cantidades de cada componente empleado para la PCR por cada 100 µl de reacción (PCR)	58
<i>Tabla 3.3.</i> Cantidades de cada componente empleado para la PCR por cada 100 µl de reacción (<i>Quick Change</i>)	61
<i>Tabla 3.4.</i> Las chaperonas y los mutantes clonadas en esta Tesis	65
<i>Tabla 3.5.</i> Clonaje de las proteínas utilizadas en esta Tesis	66
<i>Tabla 3.6:</i> Otras proteínas empleadas en esta Tesis	67
<i>Tabla 3.7.</i> Relación entre la longitud de onda de absorción y estructura secundaria de las proteínas	88
<i>Tabla 4.1:</i> Parámetros de la recolección de datos de SAXS y procesado	111
<i>Tabla 4.2:</i> Constantes de equilibrio de disociación de los complejos Hsc70:Apg2	120
<i>Tabla 4.3:</i> Constantes cinéticas para la unión del péptido FT7 a Hsc70 libre y en complejo con Apg2 o Apg2ΔAS	135

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. PLEGAMIENTO PROTEICO Y AGREGACIÓN.

1.1.1. Plegamiento proteico.

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más versátiles y estructuralmente complejas que existen. Además, su participación es imprescindible en casi todos los procesos biológicos que tienen lugar en el interior celular. La síntesis proteica tiene lugar en los ribosomas en donde, a partir de la información contenida en los ARN mensajeros, las cadenas polipeptídicas son sintetizadas en forma de polímeros lineales, los cuales contienen toda la información necesaria para que éstas se plieguen en estructuras tridimensionales adecuadas y específicas, y adquieran así su conformación nativa, necesaria para poder llevar a cabo la función biológica correspondiente (Anfinsen 1973). A este proceso se le conoce como plegamiento proteico (Dobson y Ellis 1998). Durante décadas, entender el mecanismo por el cual las proteínas adquieren su conformación nativa y cómo las células son capaces de mantener la integridad del proteoma, han sido dos de las cuestiones más relevantes en el mundo de la Biología. Hoy en día siguen sin comprenderse aspectos claves de estos procesos.

En 1961, tuvo lugar uno de los mayores avances en este campo cuando Christian Anfinsen, utilizando la ribonucleasa como proteína modelo, demostró que su plegamiento *in vitro* era un proceso espontáneo en ausencia de otros componentes celulares y, por tanto, estaba definido por su secuencia aminoacídica (Anfinsen et al. 1961). Fue galardonado con el premio Nobel de Química en 1972 por este trabajo. Anfinsen afirmaba que la estructura nativa de una proteína presentaba un mínimo de energía de Gibbs, responsable de la estabilidad termodinámica de la misma. En 1968, otro descubrimiento clave tuvo lugar cuando Cyrus Levinthal demostró que el plegamiento *in vitro* de ciertas proteínas, como la nucleasa de *Staphylococcus aureus* (una proteína de 149 residuos), ocurría en apenas 250 ms. Esto sugería que las proteínas, más que un plegamiento al azar, seguían rutas de plegamiento hacia niveles de mínima energía de Gibbs. Hasta el momento, se creía que las proteínas exploraban todas las conformaciones posibles hasta dar con la correcta, la que le proporcionase su conformación nativa. Sin embargo, el número de conformaciones que una cadena polipeptídica puede adquirir durante su proceso de plegamiento es tan grande, que la búsqueda sistemática de una estructura particular llevaría un periodo de tiempo enorme, biológicamente inviable (Levinthal 1968). Mediante esta teoría, Levinthal proponía la existencia de estructuras intermediarias de plegamiento correspondientes a mínimos locales de energía de Gibbs, a través de las cuales una proteína determinada

Introducción

se plegaba hasta adquirir su conformación nativa recorriendo una ruta o vía de plegamiento.

Para unificar el comportamiento termodinámico y cinético del plegamiento proteico se propuso el modelo del “embudo de plegamiento” (Bartlett y Radford 2009; Jahn y Radford 2005; Wolynes et al. 1995) (Figura 1.1). En este modelo se define un “paisaje energético” en el que la entropía (anchura del embudo) y energía (altura del embudo) disminuye a medida en que la proteína se dirige hacia su estado nativo. De acuerdo con este modelo, el plegamiento de una cadena polipeptídica parte de un conjunto de conformaciones desplegadas y puede seguir caminos paralelos y alternativos durante su plegamiento, pasando a través de diferentes intermediarios de plegamiento (Bartlett y Radford 2009; Hartl et al. 2011). Durante este proceso, tienen lugar una gran cantidad de interacciones débiles, no covalentes, entre los diferentes residuos de la cadena polipeptídica. Por ejemplo, en el caso de las proteínas solubles en medio acuoso, mientras que los aminoácidos de carácter hidrofóbico interaccionan entre sí para formar el núcleo apolar de la macromolécula, los residuos de carácter hidrofílico quedan expuestos hacia el exterior, interaccionando con el medio acuoso de carácter polar (Hartl et al. 2011). Sin embargo, el grado de compactación de la estructura nativa de una proteína puede ser muy variable, tal y como se observa en aquellas que poseen una estructura intrínsecamente desordenada, o verse alterada durante el paso a su conformación biológicamente activa para interaccionar de manera efectiva con el sustrato (Uversky 2010).

La forma del embudo, por lo tanto, describiría las condiciones más o menos favorables del entorno durante el proceso de plegamiento de una determinada proteína, variando dicha forma en función de las propiedades y condiciones energéticas del mismo (Jahn y Radford 2005). En una situación ideal, un embudo liso en las tres dimensiones describiría el plegamiento rápido de una proteína mediante un comportamiento de dos estados únicos: desplegado y nativo (Figura 1.1A) (Fersht 2000; Jackson y Fersht 1991). En condiciones desfavorables, el embudo se volvería irregular dando lugar a mínimos locales de energía, por los cuales la proteína pasaría adquiriendo las diferentes conformaciones intermediarias y estables de plegamiento, hasta adquirir finalmente la más estable de todas ellas, su estructura nativa, y la velocidad de plegamiento disminuiría (Dahiya y Buchner 2019). Por lo general, las proteínas o péptidos de menos de 100 aminoácidos, poseen un proceso de plegamiento sencillo que suele darse a través de una única transición energética. Sin embargo, la mayoría de las proteínas poseen secuencias de aminoácidos más largas y, por lo tanto, rutas de plegamiento más complejas. Aquí, el paso de la estructura primaria a la conformación nativa de la

proteína ocurre a través de numerosos estados intermediarios de plegamiento (mínimos locales de energía en el embudo), pudiéndose quedar atrapada en alguno de ellos si las condiciones del entorno son muy desfavorables. En estas condiciones, las barreras energéticas locales a superar por la proteína pasarían a ser demasiado elevadas y las macromoléculas quedarían atrapadas en las diferentes estructuras intermediarias, pudiendo llegar a autoasociar y agregar (Eichner et al. 2011; Jahn y Radford 2005).

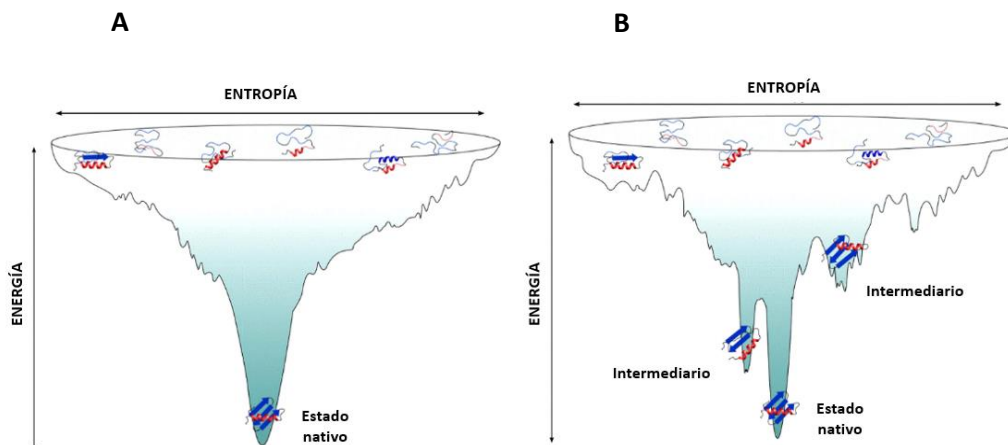


Figura 1.1: Embudos de plegamiento. *A*, embudo energético para el plegamiento de una proteína de dos estados, desplegado y nativo. *B*, plegamiento de una proteína a través de estados intermediarios.

1.1.2. Plegamiento *in vivo* y el sistema de control de calidad.

Los mecanismos básicos de plegamiento definidos *in vitro* por los estudios pioneros de Anfinsen y Levinthal distan mucho de las condiciones intracelulares, donde la concentración de macromoléculas estimada de 300-400 g/l (Goodsell 1991; Minton 2005; Zimmerman y Trach 1991), convierten el interior celular en un medio muy denso (efecto conocido como apelonamiento macromolecular del inglés “*molecular crowding*”)(Dobson y Ellis 1998). Además, otros factores como la fuerza iónica y la temperatura del contexto fisiológico distan mucho de las condiciones ideales en las que ocurre el plegamiento *in vitro*. En este entorno, las cadenas recién sintetizadas en el ribosoma encuentran un entorno aglomerado que favorece la agregación de los intermediarios inestables de plegamiento descritos en el modelo anterior. Este proceso, dependiente de la concentración, está caracterizado por cinéticas muy rápidas

y es normalmente irreversible (Dahiya y Buchner 2019; Eichner et al. 2011; Kopito y Sitia 2000; Sabate et al. 2010).

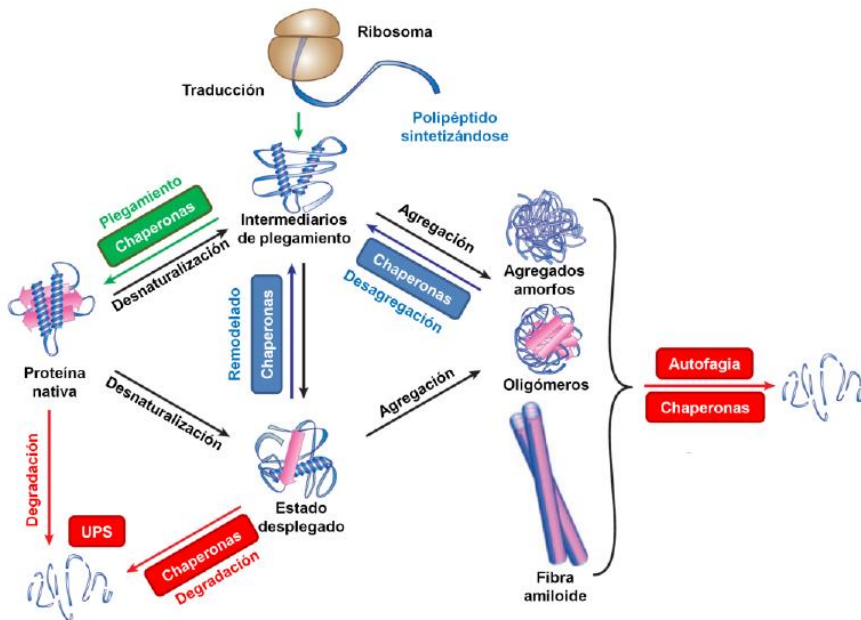


Figura 1.2: El sistema de control de calidad del proteoma. Los sistemas responsables de la proteostasis celular se componen mayoritariamente de chaperonas encargadas del plegamiento de cadenas polipeptídicas recién sintetizadas, del remodelado de proteínas parcialmente desnaturalizadas y de la solubilización y reactivación de diversos agregados proteicos. También median en las vías de degradación de agregados insolubles colaborando con el sistema UPS o de autofagia celular (Figura modificada de Kim et al. 2013).

Para favorecer el plegamiento nativo y evitar la agregación proteica, todas las células poseen un sistema de control de calidad del proteoma (Figura 1.2), compuesto por diferentes tipos de componentes celulares, entre los cuales se encuentran las chaperonas moleculares (Hartl 1996; Hipp et al. 2014; Kim et al. 2013; Powers y Balch 2013). Esta clase especial de proteínas son capaces de promover el plegamiento nativo e interactuar con las zonas hidrofóbicas que los polipéptidos exponen al medio durante su plegamiento, evitando así su agregación. Sin embargo, cuando las células se ven expuestas a diferentes situaciones de estrés (altas temperaturas, cambios en la fuerza iónica y estrés oxidativo o metabólico entre otros) que se prolongan en el tiempo (Goto et al. 1990; Stadtman y Levine 2003; Weijers et al. 2003), o la aparición de

mutaciones que desestabilizan la conformación nativa de las proteínas (Kumar y Biswas 2019; Sinha y Nussinov 2001), este sistema de control de calidad proteico se ve desbordado, provocando que la concentración de intermediarios de plegamiento y conformaciones parcialmente desnaturalizadas aumente, lo que favorece las interacciones intermoleculares y promueve la agregación proteica (Balch et al. 2008; Morimoto 2008; Powers et al. 2009). Estos agregados, inicialmente de carácter amorfo, pueden evolucionar hacia la formación de cuerpos o fibras amiloides, de estructura más ordenada y termodinámicamente más estables, caracterizados por su elevada insolubilidad y su alto contenido en estructura β (Cheon et al. 2007; Chiti y Dobson 2017; Dobson et al. 2001; Hartl et al. 2011; Muchowski 2002).

En el contexto celular, los agregados proteicos provocan por un lado un efecto inmediato de pérdida de función de las proteínas agregadas, las cuales a su vez secuestran más proteínas funcionalmente activas del entorno y, por otro, un efecto tóxico que queda evidenciado por la aparición de diversas enfermedades neurodegenerativas en humanos como el Parkinson, Alzheimer y Huntington entre otras, como consecuencia de la formación de agregados amiloides, que terminan por provocar diferentes defectos funcionales e incluso la muerte celular (Duda et al. 2002; Laurén et al. 2009; Penney et al. 1997; Spillantini et al. 1998). En condiciones no patológicas, estos agregados son continuamente eliminados o transformados por los componentes del sistema de calidad proteico celular. En primer lugar, las chaperonas moleculares intentarán que las cadenas polipeptídicas recuperen su conformación nativa mediante la desagregación y posterior reactivación de los agregados. En los casos en los que esto no sea posible, los agregados serán eliminados a través de las dos principales vías de degradación proteica intracelular: el sistema UPS (del inglés "*ubiquitin-proteasome-system*") y la autofagocitosis en los lisosomas celulares, procesos en los que también participan diferentes chaperonas moleculares. (Dikic 2017; Labbadia y Morimoto 2015)

1.2. CHAPERONAS MOLECULARES

Las chaperonas moleculares, por definición, son proteínas capaces de ayudar a otras proteínas a alcanzar su conformación nativa, funcionalmente activa, sin formar parte de su estructura final. Ron Laskey fue el primero en utilizar este concepto en 1978, para describir el papel de la nucleoplasmina en el ensamblaje de los nucleosomas a partir de histonas, ADN y extracto de huevo de *Xenopus laevis* (Laskey et al. 1978). Años

después, en 1987, Ellis y colaboradores extenderían el término para describir a proteínas que ayudaban a diferentes péptidos a adquirir su estructura nativa *in vivo* (Ellis 1988).

Hoy en día, el término chaperona molecular se utiliza para denominar a un grupo muy variado de proteínas no relacionadas filogenéticamente, capaces de unir y estabilizar conformeros inestables de otros polipéptidos para facilitar así su correcto plegamiento y ensamblaje (Hartl et al. 2011; Kim et al. 2013). Además de llevar a cabo sus principales funciones como son el plegamiento de proteínas sintetizadas *de novo*, (re)plegamiento de proteínas desnaturalizadas, prevención de la agregación y reactivación de agregados proteicos, las chaperonas también participan en otras funciones de mantenimiento del proteoma como el ensamblaje de complejos macromoleculares y el tráfico y degradación de proteínas, entre otros (Dikic 2017; Hipp et al. 2019; Kleizen y Braakman 2004; Labbadia y Morimoto 2015; Sahlan et al. 2018; Tatsuta et al. 2005; Zeytuni y Zarivach 2012).







1.2.1.-Clasificación de las chaperonas moleculares

Existen más de 20 familias de chaperonas moleculares, evolutivamente conservadas y normalmente clasificadas en función de su peso molecular (Tabla 1.1) (Hartl 1996). Algunas de ellas son expresadas constitutivamente mientras que la síntesis de las más abundantes y mejor caracterizadas se inducen bajo condiciones de estrés (como, por ejemplo, altas temperaturas) (Moran et al. 1978). Por esta razón se les denominó proteínas de choque térmico (**Heat Shock Proteins, Hsp**)(Kampinga et al. 2009). En cuanto a la localización subcelular, en general, se encuentran presentes en el citosol pero muchas de ellas tienen representantes, que reciben diferentes nombres, en orgánulos como el retículo endoplasmático, mitocondria o núcleo (Kleizen y Braakman 2004; Tatsuta et al. 2005; Zeytuni y Zarivach 2012).

En función de cual sea su mecanismo de acción, encontramos tres grupos principales de chaperonas:

- **Protección pasiva de la agregación (holdasas):** Hsp de bajo peso molecular (sHsp) y Hsp40. Interaccionan con proteínas parcialmente desnaturalizadas mediante procesos independientes de nucleótido, apantallando las regiones hidrofóbicas que éstas exponen al disolvente, evitando así su agregación. Además, pueden presentar los sustratos a otras chaperonas (Kim et al. 2013).

Tabla 1.1: Clasificación de chaperonas moleculares en función de su tamaño molecular

FAMILIA	ORGANISMO	CHAPERONA	LOCALIZACIÓN	ESTRUCTURA	FUNCIÓN
Hsp100	<i>E. Coli</i> <i>S. Cerevisiae</i>	C1pA, B, C Hsp104	Citosol Citosol	6-7 monómeros 	Confiere tolerancia al estrés celular; resolubilización de agregados insolubles formados por proteínas inactivadas durante estrés celular.
Hsp90	<i>E. Coli</i> <i>S. Cerevisiae</i> Humanos	HtpG Hsp83 Hsp90 GRP94 TRAP1	Citosol Citosol Citosol, núcleo, ER, mitocondria	dímero 	Transducción de señales intracelulares (interacción con receptores de hormonas esteroideas, con tirosinas quinasas, con seronina/treonina quinasas...); regulación de la respuesta al choque térmico; ciclo celular y su proliferación; mantenimiento de la integridad mitocondrial
Hsc/Hsp70	<i>E. Coli</i> <i>S. Cerevisiae</i> Humanos	DnaK Ssa1-4 Ssb1,2 Kar2, Ssc1 Hsc70, Hsp70 BiP, mHsp70	Citosol Citosol ER, mitocondria Citosol, núcleo ER, mitocondria	monómero 	Participa en la replicación del fago lambda; regulación de la respuesta al choque térmico; interacción con cadenas polipeptídicas recién sintetizadas; transporte interorganelar; transducción de señales intracelulares; replegamiento <i>in vitro</i> de proteínas desnaturalizadas; ciclo celular y su proliferación; actividad anti-apoptótica; presentación de antígenos en células tumorales
Hsp60	<i>E. Coli</i> <i>S. Cerevisiae</i> Plantas Humanos	GroEL/ES Hsp60 Cpn60 Hsp60	Citosol Mitocondria Cloroplasto Mitocondria	14 monómeros 	Plegamiento <i>in vitro</i> y estabilidad de proteínas desnaturalizadas; cofactor de diversos sistemas proteolíticos; ensamblaje de bacteriófagos y proteínas en plantas (Rubisco)
Hsp40	<i>E. Coli</i> <i>S. Cerevisiae</i> Humanos	DnaJ Ydj1 Hdj1, Hdj2	Citosol Citosol Núcleo	dímero 	Co-chaperona esencial para la actividad ATPasa de Hsp70; unión y liberación de sustratos
Small Hsps	<i>E. Coli</i> Humanos	IbpA, IbpB Hsp27 cristalina	Citosol Citosol Citosol	8-24 monómeros 	Inhibición de la agregación proteica <i>in vitro</i> y la inactivación inducida por estrés térmico en <i>S.cerevisiae</i> ; Termotolerancia celular mediante la estabilización de actina.

- **Plegamiento activo de polipéptidos:** Hsp70, Hsp60 y Hsp90. Mediante ciclos de unión e hidrólisis de ATP, participan activamente en el plegamiento de cadenas polipeptídicas recién sintetizadas y en el replegamiento de proteínas desnaturalizadas. Además de recibir sustratos por parte de las holdasas, también son capaces de unirlos por ellas mismas para su posterior procesamiento (Hartl et al. 2011).
- **Desagregasas:** Hsp100. Solubilizan agregados proteicos mediante la cooperación con el sistema Hsp70 de chaperonas (Acebrón et al. 2009; Fernández-Higuero et al. 2018; Lee et al. 2004; Weibezahn et al. 2004; Ziętkiewicz et al. 2004).

Otra posible clasificación de las chaperonas moleculares se puede realizar en base a su dependencia de ATP. Una de las principales características, compartida entre la mayoría de las chaperonas moleculares, es la existencia de un estado de alta y otro de baja afinidad por el sustrato. En el caso de las chaperonas dependientes de ATP, como Hsp60, Hsp70, Hsp90 y Hsp100, el cambio entre estos dos estados funcionales viene dado por la unión e hidrólisis de ATP. Por el contrario, chaperonas de las familias Hsp40 y sHsp no presentan centros de unión a nucleótidos. En cuanto a la estructura

cuaternaria, chaperonas como sHsp, Hsp60 y Hsp100 forman ensamblajes oligoméricos para ser funcionales.

A continuación, se describen las características más destacadas de las chaperonas pertenecientes a las familias sHsp, Hsp60, Hsp90 y Hsp100. Las chaperonas Hsp70 y Hsp40 se tratarán más adelante.

1.2.1.1.- sHsp

Las sHsp, del inglés *small heat shock proteins*, son un grupo diverso de chaperonas que juegan un rol crucial en el mantenimiento del control de calidad proteico en el interior celular. Sus masas varían de los 12 a los 43 KDa y, por lo general, tienden a formar grandes oligómeros de diferente tamaño y composición (desde dímeros hasta complejos de más de 20 subunidades) (Bakthisaran et al. 2015; Fu 2014; Garrido et al. 2012; Liberek et al 2008; Mymrikov et al. 2011), cuyo ensamblaje puede ser acelerado en condiciones de estrés ambiental (Garrido et al. 2012; Kriehuber et al. 2010). Los complejos formados por estas chaperonas son estructuras dinámicas que intercambian sus subunidades de manera constante para formar hetero-oligómeros con otros tipos de sHsp presentes en el medio (Carra et al. 2019). Probablemente, este intercambio dinámico de subunidades sea el responsable de otorgar la especificidad de unión a sustrato a estas chaperonas (Haslbeck y Vierling 2015). Durante el proceso de ensamblaje-desensamblaje, estos complejos exponen zonas hidrofóbicas al medio, pudiendo unir de esta manera zonas concretas de proteínas parcialmente desnaturalizadas (Bakthisaran et al. 2015; Escusa-Toret et al. 2013; Garrido et al. 2012; Jakob et al. 1993; Liberek et al. 2008; Specht et al. 2011). Una vez desaparecen las condiciones de estrés, liberan los sustratos parcialmente desnaturalizados para que puedan ser plegados por otras familias de chaperonas como las Hsp70 (Żwirowski et al. 2017). Se sabe además que la eficiencia en la reactivación de agregados por parte de sistemas de chaperonas, como por ejemplo el formado por Hsp70 y Hsp100, mejora en presencia de las sHsp, tanto *in vivo* como *in vitro* (Haslbeck et al. 2005; Kampinga et al. 1994; Mogk et al. 2003; Nillegoda et al. 2015; Ungelenk et al. 2016).

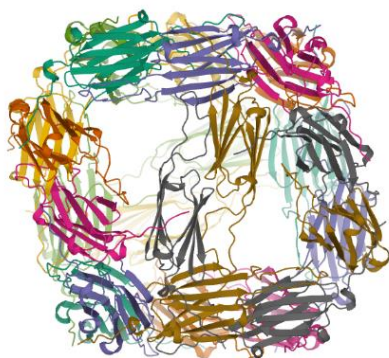


Figura 1.3: Estructura cuaternaria de Hsp16.5 de *Methanococcus Jannaschii* (pdb 1SHS) Las 24 subunidades de Hsp16.5 forman un complejo esférico, hueco, con simetría octaédrica, con ocho ventanas triangulares y seis cuadradas (Kim et al. 1998).

1.2.1.2.- Hsp60

También conocidas como chaperoninas, son complejos de entre 800-900 kDa formados por la unión de dos heptámeros en forma de anillo que dejan una cavidad en su interior, donde pueden albergar proteínas de hasta 60 kDa (Chaari 2019; Chaudhuri et al. 2009; Frydman 2001; Horwich et al. 2007; Mayer 2010).

En organismos procariotas y orgánulos endosimbóticos (mitocondrias y cloroplastos entre otros), el heptámero está formado por subunidades idénticas y requiere la colaboración con la chaperonina Hsp10 (de 10 kDa), que también forma heptámeros y actúa como tapa de la cavidad interna para la encapsulación de los sustratos (Kim et al. 2010; Saibil et al. 2013). Como ejemplos encontramos las siguientes parejas de chaperonina-cochaperonina: GroEL-GroES en bacterias (Ryabova et al. 2013), Hsp60-Hsp10 en mitocondrias y Cpn60-Cpn10/Cpn20 en cloroplastos. Las Hsp60 de arqueas y del citosol de eucariotas contienen entre 8 y 9 subunidades homologas, pero distintas entre sí, que poseen una protuberancia helicoidal en el extremo superior de su estructura que permite el cierre de la cavidad (Bigotti y Clarke 2008; Huo et al. 2010; Muñoz et al. 2011). Ejemplos representativos de este grupo son el Thermosoma/TF55 en arqueas y TRiC/CCT en el citosol eucariota (Muñoz et al. 2011). En eucariotas, Hsp60 puede formar complejos con Hsp70, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de transferencia de sustratos a la chaperonina (Schuermann et al. 2008).

1.2.1.3.- Hsp90

En condiciones fisiológicas, Hsp90 es una de las proteínas más abundantes en el citosol ya que supone el 1-2% del total del proteoma (Chaari 2019). Bajo condiciones de estrés, su expresión se ve incrementada hasta el 4-6% (Borkovich et al. 1989; Chen et al. 2006). Estas chaperonas forman homodímeros constitutivos, oligomerizando a través de su extremo C-terminal (Ratzke et al. 2010). Interviene en la

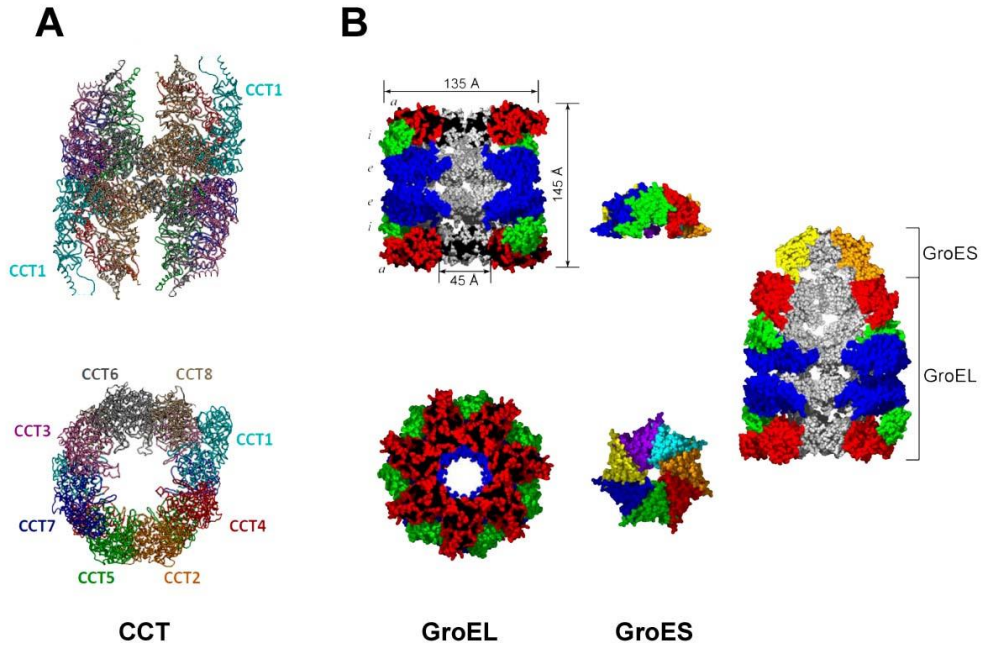


Figura 1.4: Chaperoninas de la familia Hsp60. **A**, arquitectura molecular de TRiC/CCT compuesta de las subunidades CCT1-8. Cada subunidad se muestra en un color diferente. Adaptada de (Roh et al. 2015). **B**, estructuras de GroEL, GroES y su complejo. Se muestra la cavidad interna de GroEL y la "jaula de Anfinsen" formada por el complejo GroEL-GroES. En la vista lateral del complejo, los dominios de una subunidad de GroEL se muestran con diferentes colores (apical, rojo; intermedio, verde; ecuatorial, azul) y las subunidades GroES en amarillo. Figura adaptada de Marchenkov and Semisotnov 2009.

maduración de numerosos sustratos (o clientes) que están involucrados en muchas vías celulares diferentes (Biebl y Buchner 2019; Erlejman et al. 2014; Mayer 2010; Röhl et al. 2013)

Los clientes de HSP90 incluyen, entre otros, quinasas, factores de transcripción, receptores de hormonas esteroideas y ubiquitin ligasas E3 (Taipale et al. 2012). En muchos casos Hsp90 recibe sustratos de Hsp70, con la que forma un supercomplejo a través de la proteína Hop, que interacciona con el motivo EEVD presente en el extremo C-terminal de ambas chaperonas (Alvira et al. 2014; Chen y Smith 1998; Scheufler et al. 2000).

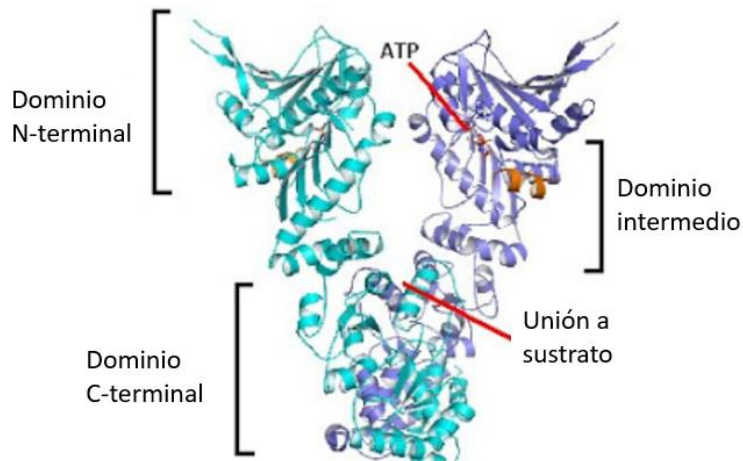


Figura 1.5: Estructura del dímero GRP94-NMC. (PDB ID 2O1V) Los dos protómeros del dímero se muestran en azul y cian. La figura muestra los diferentes subdominios (N-terminal, intermedio y C-terminal) que forman cada uno de los monómeros. La interfaz formada entre los subdominios N-terminal y dominio intermedio contienen el sitio de unión e hidrólisis para el nucleótido. Los dominios C de ambos monómeros interactúan entre sí al formar el dímero formando el bolsillo de unión a sustrato. Figura adaptada de Dollins et al. 2007.

El ciclo funcional de Hsp90 se encuentra definido por cambios conformacionales en la proteína mediados por la unión e hidrólisis de ATP (Mickler et al. 2009; Shiao et al. 2006). Tras la unión de ATP, los dominios N-terminal de ambos monómeros interactúan entre sí para formar una estructura en forma de pinza, de alta afinidad por el sustrato, permitiendo atraparlo en su interior (Meyer et al. 2004). Tras la hidrólisis del ATP, el dímero vuelve a su forma abierta dejando libre al sustrato (Mickler et al. 2009; Shiao et al. 2006) (Figura 1.5). Sin embargo, el mecanismo exacto de hidrólisis del ATP y de unión al sustrato por parte de la chaperona sigue sin conocerse por completo (Dahiya y Buchner 2019).

1.2.1.4.- Hsp100

Las Hsp100 pertenecen a la superfamilia AAA+ (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*). Los miembros de esta familia se caracterizan por estar compuestos por uno o varios dominios de unión a nucleótido (NBD) filogenéticamente muy conservados. Estas chaperonas son capaces de degradar agregados proteicos en cooperación con componentes proteolíticos o de extraer polipéptidos de los agregados para replegarlos

Introducción

y reactivarlos en cooperación con Hsp70. Las Hsp100 con actividad desagregasa mejor conocidas son las proteínas ClpB de *E. coli* y Hsp104 de *S. cerevisiae*, y contienen un dominio N-terminal y dos NBDs separados por un dominio M que los comunica y regula su actividad. La estructura biológica activa de estas proteínas es un hexámero que se mantiene estable o en continuo ensamblaje/desensamblaje dependiendo de las condiciones experimentales (Aguado et al. 2015).

La actividad chaperona de las Hsp100 es dependiente de nucleótido. La hidrólisis del ATP promueve cambios conformacionales en las subunidades del hexámero de forma alternativa, de modo que se genera una fuerza motora unidireccional que permite la translocación de polipéptidos a través de su poro central (Gates et al. 2017; Rizo et al. 2019).

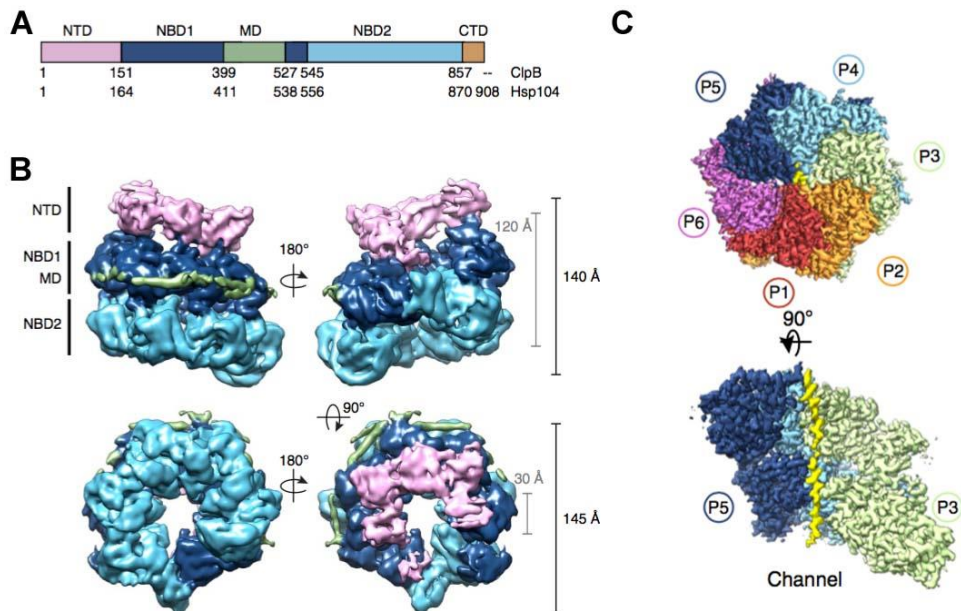


Figura 1.6: Estructura de Hsp104 y ClpB. **A**, representación esquemática de la organización de dominios de ClpB de *E. coli*, y Hsp104 de *S. cerevisiae*. **B**, mapas 3D de densidad electrónica de Hsp104 obtenidos por criomicroscopía electrónica. Los diferentes dominios se han coloreado como en A. **C**, mapa de densidad electrónica de ClpB unida a caseína, coloreado para mostrar las subunidades individuales (P1 a P6) y el sustrato (amarillo). Figura adaptada de Yokom et al. 2016 (A y B) y Rizo et al. 2019 (C).

1.3. CHAPERONAS MOLECULARES Y REACTIVACIÓN DE AGREGADOS PROTEÍCOS

¿Reactivar o degradar? Bajo condiciones de estrés, la formación de agregados proteicos aumenta de manera considerable en el interior celular, por lo que la célula debe decidir lo antes posible el destino más apropiado para los mismos y poder así garantizar su supervivencia. Esta decisión dependerá de las características intrínsecas del sustrato agregado, o las afinidades relativas de éstos por las chaperonas o por los componentes de los sistemas de degradación proteica. Algunos autores señalan que, frente a la degradación, la reactivación es la primera estrategia que la célula intenta para hacer frente a este problema (Haslberger et al. 2008; Kirstein et al. 2009; Wallace et al. 2015; Źwirowski et al. 2017). En ocasiones, el apantallamiento eficaz de las zonas hidrofóbicas de la superficie de los agregados por chaperonas como sHsps, Hsp40s o Hsp70s, puede restringir el acceso a los mismos de otros componentes del sistema de calidad proteico como, por ejemplo, chaperonas de tipo AAA+ pertenecientes a la familia de las Hsp100, que se asocian con proteasas y promueven la degradación de dichos agregados (Kirstein et al. 2009). De este modo, se favorecería la colaboración con otras chaperonas como ClpB o Hsp104 en bacterias y levaduras respectivamente, para derivar esos agregados a la ruta de desagregación/reactivación, evitando así su degradación. La fracción de sustrato recuperado dependerá de lo severas que sean las condiciones de estrés a las que se encuentra expuesta la célula (Michels et al. 1997; Nollen et al. 1999). La reactivación de agregados de proteínas es un proceso difícil que requiere la colaboración de varias chaperonas para extraer y desplegar cadenas de polipéptidos. Las principales chaperonas involucradas en procesos de reactivación de agregados proteicos se muestran en la Tabla 1.2.

Las células emplean dos sistemas diferentes para la solubilización y reactivación de agregados proteicos dependiendo del tipo de organismo del que provengan (Mogk et al. 2018). Bacterias, hongos, plantas y orgánulos como la mitocondria, emplean un sistema bichaperona basado en la colaboración entre una Hsp100 y el sistema Hsp70 (Haslberger et al. 2007; Lum et al. 2004; Miot et al. 2011; Sielaff y Tsai 2010; Tessarz et al. 2008; Weibezahn et al. 2004). Por otro lado, las células de metazoos llevan a cabo la reactivación de los agregados proteicos mediante el sistema de Hsp70, en el que juega un papel importante una chaperona de la familia Hsp110 (Rampelt et al. 2012; Shorter 2011).

Tabla 1.2: Chaperonas involucradas en procesos de solubilización y reactivación de agregados proteicos.

FAMILIA	ORGANISMO	CHAPERONA	INDUCIBLE POR ESTRÉS TÉRMICO	LOCALIZACIÓN	DISTRIBUCIÓN/TEJIDO
Hsp100	<i>E. Coli</i>	ClpA, B, C	Si	Citoplasma	
	<i>S. Cerevisiae</i>	Hsp104	Si	Citoplasma	
Hsp70	<i>E. Coli</i>	DnaK	Si	Citoplasma	
	<i>S. Cerevisiae</i>	Ssa1p	Si	Citoplasma	
	Humanos	Hsc70 (HspA8, Hsp73) Hsp70 (HspA1A/B)	No Si	Citoplasma, núcleo Citoplasma	Ubicua Ubicua
Hsp40	<i>E. Coli</i>	DnaJ	Si	Citoplasma	
	<i>S. Cerevisiae</i>	Sis1p Ydj1p	Si Si	Citoplasma, núcleo	
	Humanos	Hdj1 (DnaJb1, Hdj1)	Si	Citoplasma, mitocondria Citoplasma, núcleo	Ubicua
Hsp110	<i>S. Cerevisiae</i>	Sse1p	Si	Citoplasma	
	Humanos	Hsp105 (HspH1) Apg1 (HspH3, HspA4L) Apg2 (HspH2, HspA4)	Si No Si	Citoplasma Citoplasma, núcleo Citoplasma	Ubicua Testículos, hígado, riñón, cerebro Ubicua

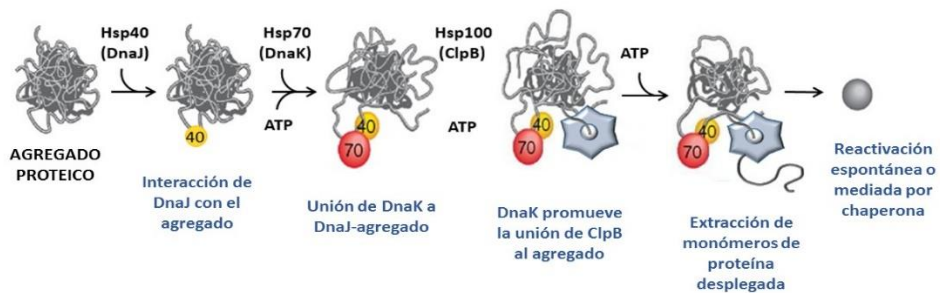
1.3.1.- Desagregasas en bacterias y levaduras: el sistema bichaperona Hsp100-Hsp70.

La reactivación de agregados proteicos en bacterias y levaduras, así como en plantas y protozoos, se realiza por la acción coordinada de una red de chaperonas con actividad desagregasa formada por los miembros de la familia Hsp100 y los componentes del sistema Hsp70, que, además de la chaperona, incluye a la cochaperona Hsp40 y un factor intercambiador de nucleótido (abreviado NEF del inglés). La Tabla 1.2 resume las proteínas características que componen este sistema en bacterias y levaduras. Además, la actividad del sistema bichaperona Hsp100-Hsp70 puede potenciarse en presencia de chaperonas sHsp (Mogk et al. 2003). Se debe destacar que sin la cooperación con Hsp100, los sistemas de Hsp70 en bacterias y levaduras muestran una capacidad de desagregación de proteínas muy limitada (Ben-Zvi et al. 2004; Diamant et al. 2000; Doyle et al. 2007; Mogk et al. 1999; Rampelt et al. 2012) e inadecuada para la supervivencia después de episodios de estrés en los que se produce la agregación de proteínas de forma severa (Queitsch et al. 2000; Sánchez y Lindquist 1990; Squires et al. 1991). La principal diferencia entre los sistemas de bacteria y levaduras atañe al componente NEF del sistema Hsp70. Mientras que en bacterias esta función la realiza la proteína GrpE, que cuenta con un homólogo en mitocondrias (Moro y Muga 2006),

en levaduras aparece la proteína Sse1p, un miembro de la familia de chaperonas Hsp110 (Dragovic et al. 2006). Estas chaperonas constituyen un grupo relacionado con las Hsp70 que se describirá más adelante.

La etapa inicial en la reactivación de polipéptidos agregados es la asociación de los diferentes componentes al agregado, que se produce de una manera secuencial *in vitro* y en la que el sistema de Hsp70 juega un papel esencial (Figura 1.7). Se ha demostrado que en *E. coli*, DnaJ se une inicialmente a los segmentos hidrófobos del sustrato que están expuestos en la superficie del agregado, para impulsar la asociación de DnaK de una manera dependiente de ATP; en un segundo paso, DnaK unida al agregado recluta a ClpB en un proceso que requiere también ATP (Acebrón et al. 2009; Ziętkiewicz et al. 2006, 2004). Varios trabajos publicados sugieren la formación de un complejo entre Hsp70 y Hsp100 en la superficie del agregado, que actúa activamente como la maquinaria de desagregación. Así, la cooperación entre las dos familias de chaperonas se produce sólo entre proteínas de la misma especie (Miot et al. 2011; Sielaff y Tsai 2010). Por otro lado, ClpB solo se asocia con alta afinidad cuando DnaK se encuentra unida a sustratos agregados y no a otros sustratos (Fernández-Higuero et al. 2018). La acción concertada de ambas chaperonas promueve la extracción de polipéptidos del agregado, en un proceso que podría implicar la translocación total o parcial de segmentos de la cadena polipeptídica a través del poro central de Hsp100 (Haslberger et al. 2007; Lum et al. 2004; Tessarz et al. 2008; Weibezahn et al. 2004). Los polipéptidos liberados al medio son replegados a continuación de forma espontánea o con la ayuda de chaperonas.

Figura 1.7 (Página siguiente): Reactivación de agregados en bacterias por el sistema bichaperona ClpB-DnaK. La reactivación de agregados proteicos ocurre de manera secuencial y es llevada a cabo por el sistema de chaperonas DnaK-DnaJ-GrpE en colaboración con la desagregasa ClpB. En primer lugar, DnaJ reconoce y une zonas hidrofóbicas expuestas de los polipéptidos desnaturalizados, y media la interacción de estos con DnaK, quien recluta moléculas de ClpB a la superficie del agregado. Las cadenas polipeptídicas son extraídas por la acción de la Hsp100, atravesando el poro central de la proteína para poder ser liberadas finalmente al medio, donde tendrán la oportunidad de recuperar su conformación nativa de manera espontánea o ayudada por otras chaperonas.



1.3.2.- Desagregasas en metazoos: el sistema de Hsp70.

La principal diferencia con el sistema descrito en bacterias y levaduras, es la desaparición de proteínas homólogas a Hsp100 en las células animales, un evento que puede estar relacionado con varios factores como son: el alto coste que supone para la célula mantener estas chaperonas en ausencia de estrés (Escusa-Toret et al. 2013) y la aparición de otros sistemas capaces de degradar los agregados como la autofagia (Lu et al. 2014). Sin embargo, los metazoos también exhiben actividad desagregasa, vinculada a la resistencia al estrés en modelos celulares (Kampinga et al. 1994) y en organismos (Kirstein et al. 2017; Rampelt et al. 2012), lo que pone de relevancia la necesidad de revertir los agregados proteicos para la supervivencia celular. En las células animales, la reactivación de los agregados proteicos se lleva a cabo por el sistema compuesto por chaperonas de las familias Hsp70, Hsp40 y Hsp110 (Rampelt et al. 2012; Shorter 2011). Es importante mencionar que la capacidad de desagregación del sistema Hsp70 de metazoos es menor que la del sistema bichaperona Hsp100-Hsp70 (Mogk et al. 2018). Sin embargo, es muy posible que los animales normalmente no requieran actividades de desagregación muy altas, dado que el riesgo y el grado de agregación de proteínas son probablemente más bajos en organismos móviles y multicelulares que en procariontes y eucariontes unicelulares y plantas sésiles, más expuestos a entornos hostiles y condiciones de estrés más severas, bajo las cuales la formación de agregados proteicos es, en muchos casos, inevitable. Este hecho podría explicar el motivo por el cual la solubilización y reactivación de proteínas agregadas en levaduras requiere la colaboración de Hsp104 con el sistema de Hsp70 (Ssa1) (Ben-Zvi et al. 2004; Diamant et al. 2000; Rampelt et al. 2012), a pesar de contener una Hsp110 (Sse1) homóloga a otras proteínas de la familia de origen animal.

La extracción, o solubilización, de las cadenas polipeptídicas del agregado para su posterior replegamiento por este sistema de chaperonas, depende de los ciclos de unión y liberación del sustrato a Hsp70 en cooperación con Hsp40 y Hsp110. En el ciclo funcional de este sistema, Hsp40 se une inicialmente al sustrato y lo transfiere a Hsp70, estimulando de forma sinérgica su actividad ATPasa (Figura 1.8A). De este modo, el sustrato queda firmemente unido a Hsp70 y debe liberarse al medio para proseguir en la ruta de plegamiento. Esto ocurre cuando se intercambia al ADP unido a Hsp70 por ATP, proceso facilitado por cofactores denominados intercambiadores de nucleótido (NEFs). En las células humanas, representantes de la familia de chaperonas Hsp110 facilitan el intercambio de nucleótido y potencian la reactivación de agregados proteicos (Gao et al. 2015; Rampelt et al. 2012; Shorter 2011). Se ha propuesto que usando estos ciclos de unión/liberación de sustratos proteicos, se produce una nucleación de las chaperonas en la superficie del agregado para formar estructuras oligoméricas de orden superior, que contienen múltiples moléculas de Hsp70 capaces de extraer cadenas polipeptídicas del agregado (Nillegoda y Bukau 2015). Los complejos entre chaperonas Hsp40 de tipo A y B, como DnaJA2 y DnaJB1, y la tendencia a la oligomerización de las Hsp70s humanas (Aprile et al. 2013; Nillegoda et al. 2015) pueden favorecer la nucleación de las moléculas de Hsc70 en el agregado. El mecanismo final por el cual Hsp70 genera la fuerza mecánica requerida para extraer polipéptidos desplegados se ha denominado tracción entrópica (de “entropic pulling”) (Figura 1.8B) (De Los Rios et al. 2006; Sousa y Lafer 2019). Este modelo considera el comportamiento termodinámico de las moléculas en espacios restringidos. Las moléculas de Hsp70 unidas a cadenas de polipéptidos agregados, experimentan una reducción considerable de sus grados de libertad de movimiento y, por lo tanto, de su entropía, ya que se encuentran parcialmente inmovilizadas en la superficie del agregado. La unión de Hsp70 podría inducir un despliegue parcial localizado del polipéptido. Se sabe que la unión de Hsp70 y Hsp40 promueve el desplegamiento de los sustratos proteicos (Rodríguez et al. 2008; Sharma et al. 2010). El desplegamiento del polipéptido favorecería el movimiento de la chaperona alejándose de la superficie del agregado, junto con el sustrato unido. El resultado de este movimiento sería un aumento inmediato de la entropía, lo que se traduciría en un cambio favorable de energía libre que podría convertirse en la fuerza direccional necesaria para extraer monómeros de polipéptidos desnaturalizados.

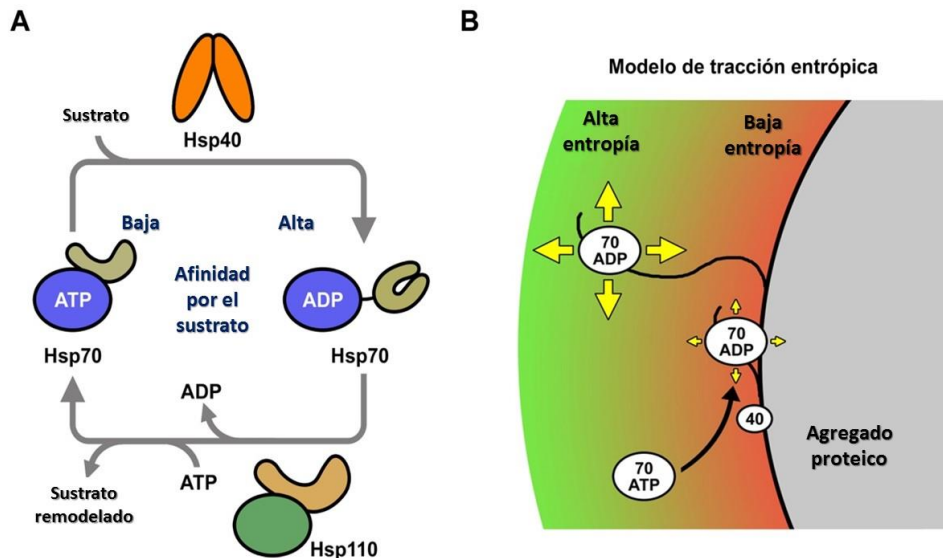


Figura 1.8: Reactivación de agregados en metazoos por el sistema de Hsp70. **A**, ciclo funcional de Hsp70 ligado a su actividad ATPasa. Los sustratos ingresan al ciclo uniéndose a Hsp40 y luego, se transfieren al estado unido a ATP de Hsp70. Tanto la cochaperona Hsp40 como el sustrato estimulan la hidrólisis de ATP por Hsp70, que atrapa el sustrato en su estado ADP. Hsp110 interacciona con la chaperona y promueve el intercambio de ADP por ATP, lo que disocia el complejo Hsp70-cliente y, por lo tanto, permite la liberación del sustrato. **B**, modelo de tracción entrópica propuesto para la solubilización de agregados de proteínas por el sistema Hsp70. Hsp40 recluta Hsp70 a la superficie del agregado, lo que resulta en una reducción de su entropía. El desplegamiento local del polipéptido unido podría permitir el movimiento del complejo Hsp70-cliente lejos de la superficie del agregado, aumentando los grados de libertad de las moléculas. Esto generaría un cambio favorable de energía libre ($\Delta G < 0$) debido al aumento de la entropía local. Figura adaptada de Velasco et al. 2019.

1.4. LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DESAGREGASA HUMANO BASADO EN EL SISTEMA HSP70

La principal diferencia del sistema Hsp70 en humanos con respecto a otras especies es la gran diversidad de proteínas pertenecientes a las familias de chaperonas Hsp70 y Hsp40. Así, el genoma humano contiene múltiples genes capaces de codificar para

diferentes proteínas Hsp70, muy conservadas y que desarrollan funciones generales o especializadas, encontrándose localizadas en diferentes compartimentos celulares, dependiendo de cuál sea su función. Al menos 13 genes diferentes codifican proteínas Hsp70 en humanos, de las cuales 6 se expresan como Hsp70 canónicas en el citosol y núcleo (HSPA1A/B, HSPA1L, HSPA2, HSPA6 y HSPA8). HSPA5 y HSPA9, también conocidas como BiP y mortalina, son los representantes fundamentales de la familia Hsp70 en el retículo endoplásmico y mitocondria, respectivamente.

Pero la diversidad tanto en el número de proteínas integrantes como en funcionalidad adquiere especial relevancia en la familia de proteínas Hsp40. En humanos, existen al menos 41 representantes de esta familia (Kampinga y Craig 2010; Vos et al. 2008), mucho menos conservados que en el caso de las Hsp70. Todos los integrantes de la familia comparten un dominio característico, el dominio J, por lo que también se las denomina JDPs (“J-domain proteins”). Aunque sus funciones se encuentran muchas veces solapadas, la eficacia con la que las realizan es diferente. Es importante destacar que la interacción de una misma Hsp70 con diferentes JDPs genera combinaciones únicas que facilitan la realización de procesos diferentes y específicos en diferentes localizaciones celulares (Kampinga et al. 2019; Kampinga y Craig 2010). En cuanto a la familia Hsp110, el genoma humano contiene tres genes HSPH1, HSPH2 y HSPH3 que codifican las proteínas denominadas Hsp105, Apg2 y Apg1, respectivamente, que se localizan en el citosol y núcleo. Las tres proteínas presentan actividad desagregasa combinadas con Hsp70 y Hsp40 (Rampelt et al. 2012).

Se han descrito varias combinaciones de chaperonas capaces de llevar a cabo la reactivación de agregados proteicos en células humanas, sin embargo, la combinación más estudiada hasta el momento y la más eficiente, tanto con agregados amorfos como ordenados, es la compuesta por Hsc70 (Hsp70), DnaJB1 (Hsp40) y Apg2 (Hsp110) (Gao et al. 2015; Rampelt et al. 2012; Shorter 2011). La inclusión de DnaJA2, otro miembro de la familia Hsp40 humana, incrementa significativamente el rendimiento de la reactivación de agregados proteicos amorfos por esta combinación de chaperonas (Nillegoda y Bukau 2015).

1.4.1. Hsc70 humana y la familia de chaperonas Hsp70

Hsc70 (HspA8) es un miembro de la familia Hsp70s humanas que se expresa constitutivamente a niveles altos, sin embargo, su expresión no se ve afectada significativamente por el estrés térmico (Hageman et al. 2011). Hsc70 se encuentra

localizada en el citosol y el núcleo de las células y se expresa en todos los tejidos del ser humano (Vos et al. 2008). Hsc70 ejerce un papel fundamental en el control de la homeostasis proteica en colaboración con diferentes co-chaperonas (Daugaard et al. 2007; Evans et al. 2010; Liu et al. 2012; Mayer y Bukau 2005; Meimaridou et al. 2009). En relación directa con el plegamiento proteico, Hsc70 ayuda a polipéptidos recién sintetizados a plegarse en su conformación nativa (Beckmann et al. 1990; Frydman y Hartl 1996), previene la formación de agregados proteicos (Jana et al. 2000; Meacham et al. 1999; Strickland et al. 1997; Watanabe et al. 2001) y participa en su solubilización y reactivación (Bukau et al. 2000; Clerico et al. 2019; Hartl y Hayer-Hartl 2002; Mayer y Bukau 2005; Young et al. 2003). Entre otras funciones de Hsc70, una de las mejor estudiadas es la liberación de moléculas de clatrina de la superficie de las vesículas formadas durante la endocitosis celular (Böcking et al. 2011, 2014; Schlossman et al. 1984; Sousa et al. 2016; Xing et al. 2010). En este proceso Hsc70 se asocia a una JDP denominada auxilina (DnaJC6), para unirse a los trisqueliones de clatrina y separarlos de la superficie del endosoma utilizando para ello la energía generada por la hidrólisis del ATP (Sousa et al. 2016). Hsc70 también participa en procesos de degradación proteica, mediante su participación en la ruta ubiquitina-proteasoma (Connell et al. 2001; Fernández-Fernández et al. 2017; Hjerpe et al. 2016; Höhfeldest al. 2001; Meacham et al. 2001). Además, es clave en el proceso de autofagia mediada por chaperonas, seleccionando aquellas proteínas que han de ser degradadas en el lisosoma (Ciechanover 1998; Hjerpe et al. 2016; Kampinga et al. 2019). Por otro lado, Hsc70 ejerce un papel importante en el proceso de translocación proteica a través de membranas, participando en la importación y exportación de diversas proteínas a través de la membrana nuclear, mitocondrial y del retículo endoplasmático (Bukau et al. 2006; Chirico et al. 1988; Deshaies et al. 1988; Florin et al. 2004). Por último, también participa en el proceso de transporte de orgánulos a través de los microtúbulos celulares (Terada et al. 2010; Tsai et al. 2000) y en diversos procesos de comunicación intercelular, pues algunos estudios revelan su presencia en el espacio extracelular y la membrana celular (Barreto et al. 2003; Nirdé et al. 2010).

1.4.1.1.- Características generales de la familia Hsp70

Las Hsp70 son proteínas monoméricas de alrededor de 70 kDa, aunque diversos estudios recientes señalan su capacidad de oligomerizar, lo que puede conllevar importantes consecuencias funcionales (Takakuwa et al. 2019). Las Hsp70 son proteínas esenciales para la vida y constituyen una de las familias de proteínas más conservadas desde el punto de vista evolutivo, ya que se encuentran presentes en todos los organismos vivos, desde las arqueobacterias hasta los mamíferos superiores. Al aumentar la complejidad de los organismos, se ha observado que también aumenta

el número de genes que codifican proteínas Hsp70. Así, mientras que los procariotas presentan pocos genes de proteínas Hsp70 (de 1 a 3), en eucariotas pueden existir entre 15 y 20 Hsp70 diferentes (Hageman et al. 2011; Stricher et al. 2013), distribuidas en el citosol, núcleo y orgánulos, cuyas funciones son reguladas por una gran variedad de cochaperonas que, de manera selectiva, las dirigen a diferentes regiones subcelulares y les permiten cooperar específicamente con otros sistemas de chaperonas (Mayer y Bukau 2005; Stricher et al. 2013). La gran homología existente entre las Hsp70 de diferentes orígenes posiblemente se encuentra relacionada con el rol esencial para la vida celular que realizan estas proteínas y la conservación de su mecanismo funcional. De hecho, *in vivo*, las Hsp70s de *Drosophila* y humanos son capaces de proteger a células de otras especies, como ratón (Pelham 1984) y roedor (Jaattela et al. 1992; Li et al. 1991), respectivamente, frente a diferentes tipos de estrés.

Las funciones más habituales de las chaperonas Hsp70 están directamente relacionadas con la homeostasis proteica y la protección de las células frente a situaciones de estrés, así como funciones constitutivas como se ha mencionado anteriormente para Hsc70 humana (Kampinga et al. 2019; Mayer y Bukau 2005; Stricher et al. 2013). Entre los más importantes, encontramos plegamiento de proteínas recién sintetizadas, replegamiento de proteínas parcialmente desnaturalizadas o agregadas, protección frente a la agregación, reactivación de agregados proteicos, ensamblaje de estructuras macromoleculares, translocación de proteínas a través de membranas, o el control de la actividad de proteínas reguladoras entre otras. Las Hsp70 realizan estas funciones gracias a su capacidad de unir secuencias polipeptídicas cortas (entre 3-5 residuos) de carácter hidrofóbico de una forma regulada por la unión e hidrólisis de ATP. Es habitual encontrar uno o varios sitios de unión para Hsp70 con estas características expuestos en proteínas que se han desplegado parcial o totalmente, o incluso en proteínas nativas (Mayer y Gierasch 2019).

1.4.1.2.- Dominios funcionales y estructura de Hsp70

Las Hsp70 son proteínas multidominio con una organización similar que consiste en (Figura 1.9)(Mayer y Bukau 2005; Stricher et al. 2013):

- i) un dominio N-terminal de unión a nucleótido, abreviado NBD (de *Nucleotide Binding Domain*) de unos 44 kDa encargado de unir e hidrolizar ATP,

A



B

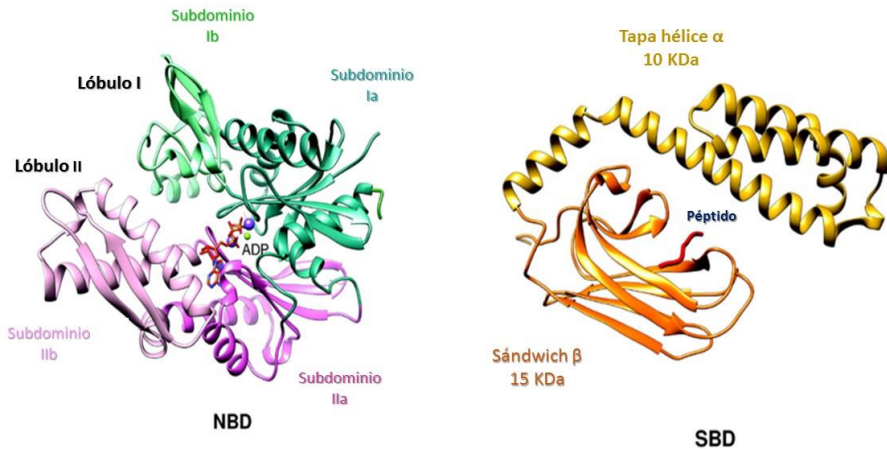


Figura 1.9: Estructura de los dominios de Hsp70. A, organización de los dominios de las proteínas de la familia Hsp70 DnaK. Figura de (Aguado, Fernández-Higuero, Moro, et al. 2015). B, Estructura de los dominios NBD (PDB ID 3HSC) (izquierda) y SBD (PDB ID 1DKZ) (derecha) de HSPA8. Figura adaptada de Stricher et al. 2013.

- ii) un dominio C-terminal de unión a sustrato, abreviado SBD (de Substrate Binding Domain) de unos 28 kDa capaz de unir transitoriamente péptidos pequeños o segmentos hidrofóbicos de proteínas parcialmente desnaturalizadas, y
- iii) una secuencia conectora entre los dos dominios de carácter hidrofóbico (*linker*) de 6 residuos muy conservados, que es responsable de transmitir los cambios conformacionales alostéricos que tienen lugar durante el ciclo ATPasa de la chaperona.

El NBD tiene un plegamiento similar a actina y se compone de dos grandes lóbulos (I y II), cada uno dividido a su vez en dos pequeños subdominios (A y B). Estos cuatro subdominios se disponen entre sí generando una hendidura a la que se une el

nucleótido en complejo con un Mg^{2+} y dos K^+ , produciéndose interacciones específicas tanto de la adenosina como de los fosfatos β - y γ - con diferentes residuos de la proteína que facilitan la hidrólisis del ATP (Flaherty et al. 1990; Mayer y Bukau 2005; Stricher et al. 2013) (Figura 1.9B). Estudios recientes de resonancia magnética nuclear sugieren que la gran flexibilidad de este dominio permite la apertura o cierre de la hendidura central en función de cuál sea el nucleótido que alberga en su interior, siendo la dependencia entre la frecuencia de dicha apertura (γ , por lo tanto, velocidades de disociación) y la naturaleza del nucleótido unido la siguiente: APO > ADP > ADP + Pi > ATP (Gässler et al. 2001; Mayer y Bukau 2005; Zhang y Zuiderweg 2004).

El SBD está formado por dos subdominios muy diferenciados cuya interacción facilita el secuestro de sustratos proteicos. Por un lado, encontramos al subdominio SBD β , con una estructura de sándwich β de 15 kDa, compuesto por dos láminas β antiparalelas, cada una de ellas formadas a su vez por cuatro hebras β ($\beta 3$, $\beta 6$, $\beta 7$ y $\beta 8$ la primera, y $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$ y $\beta 5$ la segunda) y cuatro lazos conectores. Este subdominio alberga un sitio de unión en el que se pueden acomodar péptidos hidrofóbicos cortos (Zhu et al. 1996). El segundo subdominio, SBD α , de unos 10 kDa, está formado por cinco hélices α (de la A a la E), que se pliegan sobre el SBD β y establece interacciones con este subdominio que permiten atrapar el péptido unido a éste (Fernández-Sáiz et al. 2006; Moro et al. 2004; Zhu et al. 1996). Por este motivo, el SBD α ha recibido el nombre de “lid” (tapa en inglés) en numerosos trabajos. Se ha demostrado que, en el caso de clientes proteicos, el SBD α no se cierra completamente sobre el SBD β y puede establecer contactos con el sustrato (Schlecht et al. 2011). Finalmente, el SBD termina en un segmento corto de longitud variable en conformación intrínsecamente desordenada, imprescindible para la oligomerización de la proteína (Benaroudj et al. 1997) y, que en el caso de Hsp70 eucariotas, finaliza frecuentemente en la secuencia EEVD, importante para la interacción con Hsp40, Hsp90 y diversas cochaperonas como Hop y Chip.

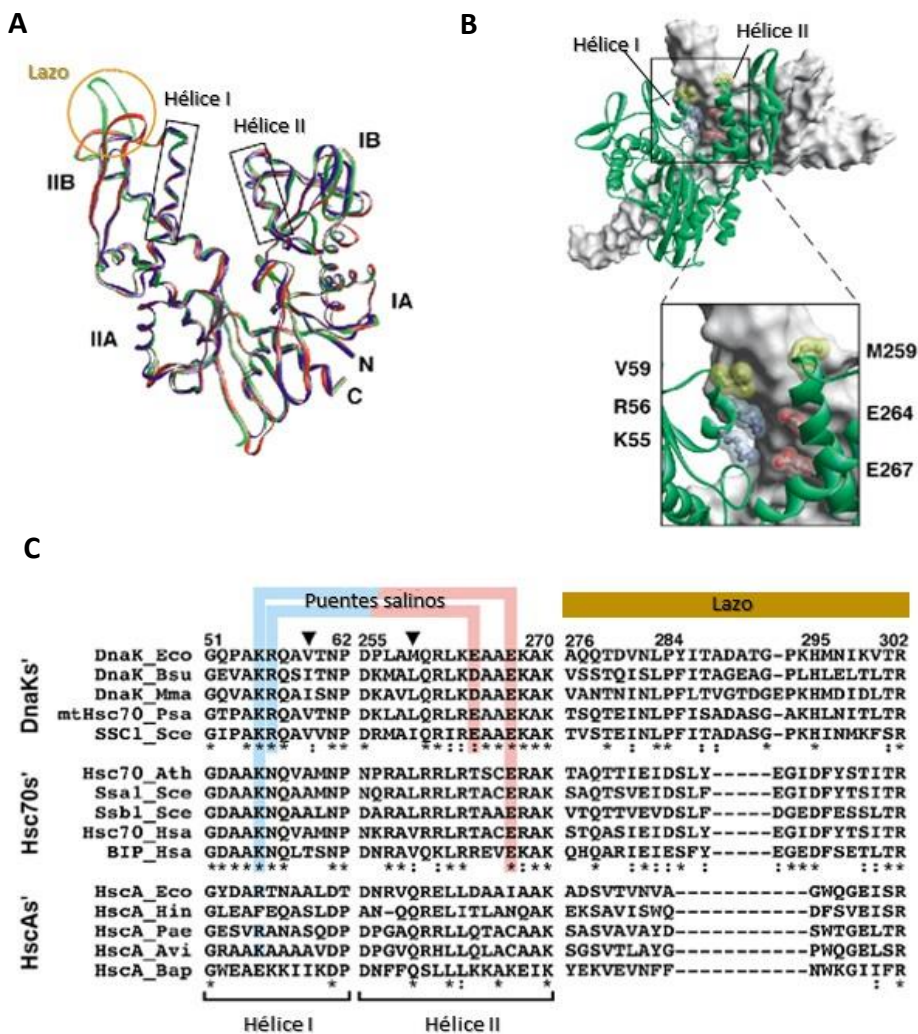
El lazo conector que une el NBD y SBD posee una secuencia evolutivamente muy conservada y juega un papel clave en la regulación alostérica de la chaperona en respuesta a la unión e hidrólisis de ATP (Vogel et al. 2006). Cuando el NBD de la Hsp70 se encuentra vacío o unido a ADP, el lazo conector posee una estructura desordenada que permite que el NBD y el SBD se encuentren físicamente separados (Bertelsen et al. 2009). Sin embargo, en el estado ATP, el lazo conector adquiere una conformación de hebra β y se inserta en el NBD promoviendo el acoplamiento del NBD y el SBD, y la compactación global de Hsp70 (Zhuravleva y Gierasch 2011).

1.4.1.3.- Diferencias estructurales entre las Hsp70

Aunque las estructuras descritas para las diferentes Hsp70 son prácticamente superponibles, existen ligeras diferencias entre ellas que las hacen responsables de varias de las diferencias funcionales existentes entre las componentes de esta familia de chaperonas.

En primer lugar, las diferencias encontradas en el NBD permiten clasificar a todas las Hsp70 en tres grandes familias, basándose en tres proteínas modelo: DnaK y HscA de *E.Coli* y Hsc70 humana (Brehmer et al. 2001). Por un lado, encontramos diferencias en la longitud de un lazo presente en el subdominio IIB, cerca del bolsillo de unión a nucleótido. Mientras que los miembros de la subfamilia DnaK presentan un lazo especialmente largo, necesario para la interacción con el NEF bacteriano GrpE, los de las pertenecientes a las subfamilias Hsc70 y HscA, constan de cuatro y diez residuos menos, respectivamente. Además, mientras que los lazos de DnaK y Hsc70 presentan secuencias conservadas específicas de cada una de las familias, el de HscA se encuentra menos conservado evolutivamente y presenta una gran variabilidad en su secuencia.

Figura 1.10 (página siguiente): Diferencias estructurales que afectan al NBD y SBD de Hsp70. A, Superposición de los modelos del dominio de unión a nucleótido de DnaK (verde), HscA (azul) y Hsc70 (rojo). Se resaltan las diferencias en el lazo situado en el subdominio IIB y en la interfase de la hendidura de unión a nucleótidos formada por las hélices I y II. B, Vista en detalle de la interfase de la hendidura de unión a nucleótido de DnaK de *E.Coli* en su conformación unida a ADP. Se muestran los dos puentes salinos formados entre R56 y K55 de la hélice I con E264 y E267 de la hélice II, respectivamente. También se observa el parche hidrofóbico formado por V59 y M259 a la entrada de dicha hendidura, situados en las hélices I y II, respectivamente. C, Alineamiento de las secuencias de miembros pertenecientes a las tres subfamilias de Hsp70. Se resaltan los residuos que participan en los puentes salinos (azul y rojo) y en el parche hidrofóbico (triángulos) formados entre ambas hélices, y las diferentes extensiones del lazo situado en el subdominio IIB de cada Hsp70 (naranja). Figura adaptada de Brehmer et al. 2001.



La otra gran diferencia reside en la existencia de un parche hidrofóbico y dos puentes salinos en la parte superior de la hendidura central de dominio de unión a nucleótido, principales responsables de la polaridad de este bolsillo. Mientras que DnaK posee los tres elementos mencionados, las proteínas pertenecientes a la subfamilia de Hsc70 carecen del parche hidrofóbico y de uno de los puentes salinos, y las de HscA no presentan ninguno de los tres elementos descritos. La importancia de estas diferencias estructurales reside en que parecen ser las responsables de regular las cinéticas de unión y disociación de los distintos nucleótidos a la proteína. Por un lado, el parche hidrofóbico y los puentes salinos parecen actuar a modo de “trampa”, permitiendo el cierre del bolsillo de unión a nucleótido. Por otro lado, y aunque menos obvio, parece

que, debido a su largura, el lazo pueda actuar a modo de pestillo, interaccionado con el subdominio IB durante la compactación del NBD.

Lo descrito en estos párrafos es interesante ya que, curiosamente, las diferencias estructurales observadas en los NBDs de estas tres subfamilias parecen ser responsables de la regulación de la etapa en la que se produce el intercambio de ADP por ATP en la chaperona. De esta manera, las proteínas de la subfamilia de DnaK de *E. coli* requieren la presencia de la proteína intercambiadora de nucleótido GrpE para llevar a cabo su actividad tanto *in vivo* como *in vitro*. En el extremo opuesto encontraríamos las homólogas de HscA que presentan velocidades de disociación de ADP elevadas, de modo que no necesitarían colaborar con proteínas NEF para ser funcionales. Por último, Hsc70 tendría velocidades de disociación de ADP intermedias y, aunque son capaces de llevar a cabo su actividad en solitario, necesitan colaborar con proteínas intercambiadoras, como los componentes de las familias de proteínas BAG o Hsp110, para la realización de sus funciones (Brehmer et al. 2001).

En cuanto al dominio de unión a sustrato, el grado de conservación del SBD β entre todas las homólogas de la familia de Hsp70 es muy elevado, mientras que la homología del SBD α es baja. Diversos estudios han demostrado que mutaciones y/o alteraciones del arco hidrofóbico en el SBD α que envuelve al péptido provocan cambios en la especificidad y en la afinidad de Hsp70 por los diferentes sustratos (Mayer et al. 2000). Por otro lado, la sustitución del SBD α de Hsp70 diferentes provoca modificaciones conformacionales y la pérdida de función (Moro et al. 2002, 2005). Por estos motivos, cabe pensar que las variaciones estructurales del SBD hayan sido evolutivamente esenciales para la especialización de las diferentes Hsp70.

1.4.1.4.- Ciclo conformacional de Hsp70

La actividad remodeladora de sustratos proteicos de las Hsp70 depende de sucesivos ciclos de unión y disociación de los clientes, en los que la chaperona alterna entre dos estados conformacionales de alta y baja afinidad por el sustrato, acoplados a la unión e hidrólisis de ATP. Los estudios realizados a lo largo de las pasadas décadas, fundamentalmente con las proteínas HSPA1A y HSPA8 (humanas o bovinas), y la homóloga procariota DnaK (*E. coli*), han permitido conocer con cierto detalle el mecanismo alostérico complejo que regula los cambios conformacionales que ocurren entre los estados unidos a ADP y a ATP (Chiappori et al. 2016; Daily y Gray 2009; English et al. 2017; General et al. 2014; Liu y Hendrickson 2007; Nicolaï et al. 2013; Smock et al. 2010; Zhuravleva et al. 2012). A pesar de que las diferencias estructurales existentes entre las Hsp70 de un mismo organismo y entre las de diferentes especies determinan

la función de la chaperona y la interacción específica con sus correspondientes sustratos, el mecanismo alostérico que guía los cambios conformacionales y que conecta los dos dominios de la proteína (SBD y NBD) parece estar muy conservado (Clerico et al. 2019; Lai et al. 2017; Meng et al. 2018).

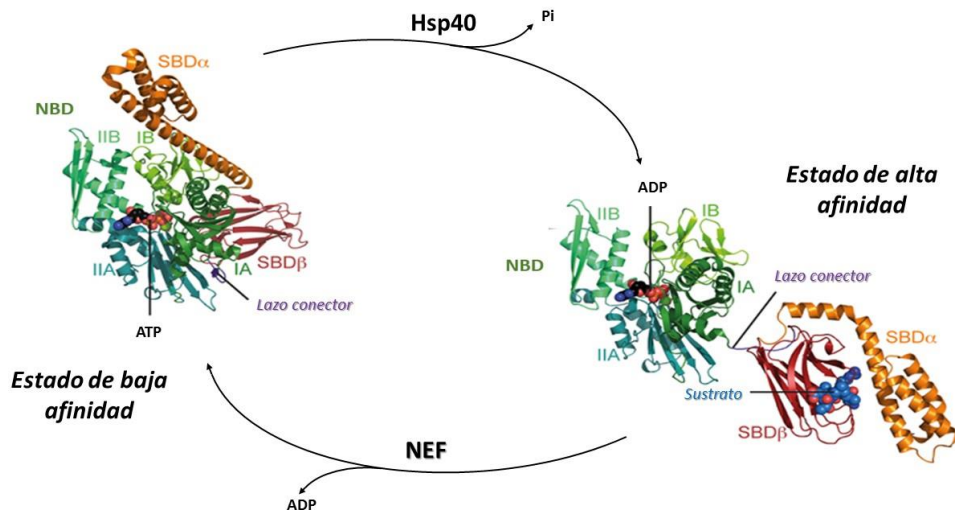


Figura 1.11: Ciclo conformacional de Hsp70. DnaK de *E. coli* (PDB ID 4B9Q)(Kityk et al. 2012) unida a ATP (izquierda). El lazo conector se encuentra inserto en forma de lámina β entre los subdominios IA y IIA del dominio de unión a nucleótido, permitiendo de esta manera una estrecha interacción entre los dominios SBD y NBD de la proteína. En esta conformación la afinidad de Hsp70 para unir al sustrato es baja. DnaK de *E. coli* (PDB ID 2KHO)(Bertelsen et al. 2009) unida a ADP (derecha). La hidrólisis de ADP genera cambios conformacionales en el NBD que conllevan la liberación del lazo conector, el cual adopta una estructura desordenada que permite la separación de los dominios SBD y NBD de la proteína. En esta conformación la afinidad de Hsp70 por el sustrato es alta. Figura adaptada de Mayer y Kityk 2015.

En el estado de Hsp70 unido a ADP, NBD y SBD actúan de forma independiente excepto por las restricciones impuestas por el lazo conector en conformación desordenada (Zhuravleva et al. 2012) (Figura 1.11). El SBD se encuentra en una conformación cerrada por lo que el sustrato peptídico se asocia a este dominio con alta afinidad, pero con cinéticas de asociación y disociación lentas (alrededor de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y 10^{-3} s^{-1} , respectivamente). La unión de ATP al centro catalítico en el NBD provoca una rotación de los lóbulos I y II entre sí, abriendo una hendidura en la parte inferior del NBD donde

se une el lazo conector en conformación de hebra β (Figura 1.11). Los subdominios del SBD se separan, asociándose a diferentes regiones del NBD: el SBD α se une al subdominio IB y el SBD β lo hace a los subdominios IA y IIB (Figura 1.11). Esto provoca una reorganización del SBD β que abre el sitio de unión, facilitando la salida del sustrato al medio. En el estado ATP, la K_d por el sustrato incrementa alrededor de 10 veces, lo que se acompaña de un aumento de 100 y 1000 veces en las velocidades de asociación y disociación, respectivamente (Buczynski et al. 2001; Mayer et al. 2000). Por otro lado, la interacción del SBD β con el NBD provoca que los residuos catalíticos adquieran una conformación inadecuada para la hidrólisis del ATP (Kityk et al. 2015), lo que explica la baja actividad ATPasa basal de las Hsp70. La unión de un sustrato polipeptídico y, en especial, la inserción de un residuo en el sitio de unión hidrofóbico del SBD β , induce la liberación de este subdominio del NBD (Kityk et al. 2015; Zhuravleva et al. 2012). Esto permite la reorganización de los lóbulos del NBD hacia una posición más adecuada para la hidrólisis del ATP. De modo concomitante, el SBD α se disocia del NBD y cierra el sitio de unión interaccionando nuevamente con el SBD β . Estos cambios conformacionales también provocan que el lazo conector se desordene y salga de la hendidura entre los lóbulos IA y IIA del NBD, lo que conlleva la pérdida de la posición óptima para la hidrólisis del ATP. Por este motivo, los sustratos solo estimulan moderadamente la actividad ATPasa de las Hsp70 y, por tanto, precisan de la colaboración con cochaperonas para completar su ciclo funcional de manera eficiente.

1.4.1.5.- Regulación del ciclo funcional de Hsp70 por cochaperonas

El ciclo conformacional de las Hsp70 siempre se encuentra regulado por dos cochaperonas que actúan de forma independiente sobre las dos fases del ciclo: la hidrólisis de ATP y el intercambio ADP/ATP para reiniciar un nuevo ciclo. Por un lado, la interacción de Hsp70 en el estado ATP con cochaperonas de la familia Hsp40 promueve una estimulación de la actividad ATPasa de la chaperona de una forma sinérgica con el sustrato (Figura 1.11). De este modo, la tasa de hidrólisis de ATP de DnaK de *E. coli* se incrementa hasta 15.000 veces, respecto a la actividad basal en presencia de DnaJ, la principal Hsp40 bacteriana, y de un sustrato peptídico (Laufen et al. 1999). Un estudio reciente revela que la unión del dominio J de Hsp40 al NBD de Hsp70 previene la salida del lazo conector, favoreciendo una conformación más competente para la hidrólisis del ATP (Kityk et al. 2018). El dominio J está muy conservado entre las proteínas Hsp40 lo que sugiere que el mecanismo de activación de la ATPasa de Hsp70 es similar en todas ellas.

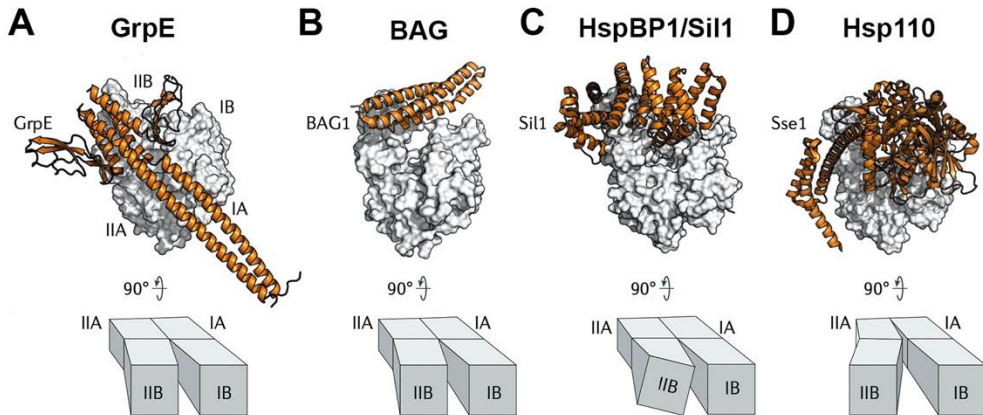


Figura 1.12: Factores de intercambio de nucleótidos de Hsp70. Estructura de diferentes complejos Hsp70:NEF y representación esquemática de los cambios conformacionales del NBD de Hsp70 producidos tras la unión de: **A**, GrpE de *E. coli* (PDB ID 1dkg); **B**, BAG (PDB ID 1hx1); **C**, Sil1 (PDB ID 3qml); **D**, Hsp110 de *S. cerevisiae* (PDB ID 3d2f). Figura adaptada de Rosenzweig et al. 2019

Por otro lado, los factores de intercambio de nucleótido (NEF) median la apertura del bolsillo de unión de nucleótidos en el NBD, facilitando la disociación del ADP y su intercambio por ATP. Estos pasos constituyen las etapas limitantes para la liberación del sustrato por parte de la Hsp70, por lo que este proceso se encuentra altamente regulado y está sujeto a una fuerte variación evolutiva que afecta tanto los residuos del NBD de Hsp70 implicados en la interacción con el NEF, como a la propia proteína NEF responsable de la especificidad de la interacción con Hsp70. Así, existen cuatro grandes familias de proteínas NEF no relacionadas estructuralmente que actúan con mecanismos diferentes (Bracher y Verghese 2015; Mayer y Gierasch 2019). En procariontes, mitocondrias y cloroplastos, el intercambio ADP/ATP en Hsp70s se ve facilitado por la proteína GrpE, un homodímero que consiste en una hélice α larga, que forma un ovillo trenzado en la mitad N-terminal de la proteína, y un dominio formado fundamentalmente por estructuras β en el segmento C-terminal (Harrison et al. 1997). Al interactuar con DnaK, GrpE introduce el dominio β entre los subdominios IB y IIB del NBD de la chaperona induciendo la apertura del centro de unión de nucleótido mediante la inclinación del subdominio IIB, lo que reduce enormemente la afinidad por el nucleótido unido (Figura 1.12A).

En las células eucariotas existen tres tipos de NEFs que pertenecen a las familias BAG, HspBP1/Sil1 y Hsp110 (Bracher y Verghese 2015; Mayer y Gierasch 2019). Las proteínas

BAG constituyen una familia divergente que contiene 5 componentes en humanos. Se caracterizan por contener el dominio BAG, muy conservado, que consiste en un ovillo de tres hélices α que interacciona con los subdominios IB y IIB del NBD de Hsp70 (Sondermann et al. 2001). Esto induce una conformación del NBD en la que el subdominio IIB se mueve hacia fuera (Figura 1.12B), de modo similar a lo mencionado anteriormente para el complejo entre DnaK y GrpE. HspBP1 y Sil1 humanas son proteínas con actividad NEF presentes en el citosol y el lumen del ER, que contienen un dominio con una estructura del tipo repeticiones Armadillo (Shomura et al. 2005). Este dominio interacciona con el NBD de Hsp70 envolviendo al subdominio IIB, lo que provoca una rotación de éste (Figura 1.12C). Por último, las proteínas de la familia Hsp110 promueven el intercambio de nucleótido mediante una interacción con el NBD de Hsp70 que rota el subdominio IIB hacia afuera (Figura 1.12D), de modo similar a GrpE y BAG. Las características de esta familia de proteínas se tratarán en detalle en el apartado 1.4.3.

1.4.1.6.- Mecanismo de plegamiento de Hsp70

El mecanismo por el cual Hsp70 asiste al plegamiento de sustratos proteicos desnaturalizados todavía no está claro. Sin embargo, se sabe que este proceso puede ocurrir en más de un minuto y que por lo general son necesarios varios ciclos de unión y liberación del sustrato por parte de la chaperona para que éste pueda alcanzar su conformación nativa. Se postulan dos teorías para explicar este proceso:

- Partición cinética: Hsc70 ejercería un rol pasivo en el cual sucesivos ciclos de unión y liberación de los sustratos, darían lugar a una disminución de la concentración local de péptidos desnaturalizados. De esta manera, la probabilidad de agregar entre ellos disminuiría y la adquisición de su conformación nativa se vería favorecida (Goloubinoff y Rios 2007; Mayer y Bukau 2005).
- Desplegamiento local: Sucesivos ciclos de unión y liberación del sustrato mal plegado por parte de Hsp70 inducirían un desplegado local de éste, permitiendo de esta forma superar la barrera energética necesaria para poder alcanzar su conformación nativa (Sousa 2014).

1.4.2.- DnaJB1 y DnaJA2 humanas y la familia de chaperonas Hsp40

Entre las numerosas proteínas de la familia Hsp40 en humanos, DnaJB1 y DnaJA2, también denominadas Hdj1 y Dj3, se encuentran implicadas en la solubilización y reactivación de agregados proteicos (Kampinga et al. 2019; Kirstein et al. 2017; Nillegoda y Bukau 2015; Rampelt et al. 2012). DnaJA2 y DnaJB1 pertenecen, respectivamente, a las clases A y B de Hsp40 (ver apartado 1.4.2.1) y ambas proteínas se expresan fundamentalmente en el citosol de células humanas en cultivo (Hageman et al. 2011). Bajo estrés térmico, los niveles de DnaJB1 aumentan enormemente mientras que los de DnaJA2 apenas varían (Hageman et al. 2011) Aunque ambas Hsp40 son importantes para la homeostasis y el mantenimiento del control de la calidad proteica en el interior celular (Reidy et al. 2014), la eficacia con la que llevan a cabo sus funciones difiere (Baaklini et al. 2012; Rampelt et al. 2012; Tzankov et al. 2008).

Diversos estudios sugieren que la especificidad y las cinéticas de unión a sustratos de ambas Hsp40 es diferente (Fan et al. 2004; Kakkar et al. 2014). Este hecho hace que, aunque ambas posean la capacidad intrínseca de prevenir la agregación proteica al unirse a sustratos desplegados (Mok et al. 2018; Scior et al. 2018), la eficacia de DnaJA2 sea mayor (Nillegoda y Bukau 2015). Por otro lado, la naturaleza, estructura, condiciones de agregación, grado de compactación y tamaño los agregados proteicos definen su eficacia en el proceso de reactivación de agregados proteicos junto con Hsc70 y Apg2 (Kirstein et al. 2017; Nillegoda et al. 2015). Así, cuando el sistema de Hsc70 contiene solo una de estas Hsp40s, DnaJB1 muestra una actividad desagregasa muy superior a DnaJA2 frente a diferentes tipos de agregados (Nillegoda et al. 2015; Rampelt et al. 2012), especialmente de gran tamaño (de 700 a 5.000 kDa), mientras que DnaJA2 presenta mayor actividad frente a agregados de menor masa molecular (200-700 kDa) (Nillegoda y Bukau 2015).

La combinación de DnaJA2 y DnaJB1 junto con Hsc70 y Apg2 aumenta enormemente la eficacia del sistema de chaperonas humanas para reactivar agregados formados en condiciones severas, como Luciferasa desnaturalizada térmicamente (Nillegoda y Bukau 2015). Esta sinergia entre las dos Hsp40 está relacionada con la interacción transitoria entre ambas proteínas para generar complejos, que posiblemente permiten la formación de estructuras con Hsc70 y Apg2 de orden superior, que faciliten la nucleación de las chaperonas en la superficie del agregado (Nillegoda y Bukau 2015). La formación de complejos entre DnaJA2 y DnaJB1 involucra a los dominios J y CTD de ambas proteínas (ver apartado 1.4.2.1) y se ha demostrado que ocurre tanto *in vitro* como en células humanas (Kirstein et al. 2017; Nillegoda y Bukau 2015; Nillegoda et al.

2015, 2017). Estos dominios presentan un patrón de potenciales electrostáticos complementarios (Nillegoda y Bukau 2015), que es específico de organismos eucariotas y determina la formación de complejos entre JDPs de diferentes clases (Kirstein et al. 2017)(Nillegoda et al., 2017). Los complejos entre dos Hsp40 de diferentes clases no son exclusivos del ser humano y se extiende a otros organismos eucariotas como las levaduras, pero no a las bacterias, y correlaciona con su acción sinérgica en la solubilización y reactivación de agregados proteicos (Kampinga et al. 2019; Kirstein et al. 2017; Nillegoda et al., 2017).

1.4.2.1.- Dominios funcionales y estructura de proteínas de la familia Hsp40

Las Hsp40 forman parte de una gran familia de proteínas denominadas JDPs (“J-domain proteins”) que se caracterizan por la presencia del dominio J, denominado así por el miembro fundador de la familia: la proteína DnaJ de *E. coli*. Este dominio de unos 70 aminoácidos está muy conservado entre las JDPs de diferentes organismos, y desempeña un papel esencial en la estimulación de la actividad ATPasa de las Hsp70 (Kampinga et al. 2019). El dominio J se compone de cuatro hélices α que interactúan entre sí para proporcionar la orientación adecuada que permite al dominio llevar a cabo su función (Figura 1.13A). Las hélices II y III se disponen de manera antiparalela simulando un “dedo” saliente en cuyo extremo se encuentra el motivo HPD (histidina-prolina-aspartato), totalmente conservado y esencial para la estimulación de la hidrólisis de ATP de Hsp70 (Tsai y Douglas 1996; Walls et al. 1994). Las hélices 1 y 4 se posicionan rodeando a las otras dos hélices confiriéndoles estabilidad.

A excepción de este dominio J, esta familia de chaperonas es muy divergente, probablemente debido a las diferentes funciones que llevan a cabo (Craig y Marszalek 2017; Kampinga y Craig 2010). Atendiendo a la composición de dominios que contienen, las JDPs pueden clasificarse en tres grupos principales (Figura 1.13B):

- **Clase A (o Tipo I):** las proteínas de este grupo presentan una composición de dominio y estructura similar a la de DnaJ de *E. coli*. Contienen el dominio J en su extremo N-terminal, seguido de una región muy flexible debido a su alto contenido en glicinas y fenilalaninas, llamada dominio G/F, y los dominios C-terminales CTD-I y CTD-II con conformación de sándwich β . El CTD-I se caracteriza por la inserción de un dominio rico en cisteínas capaz de unir $Zinc^{2+}$ (ZBD) y el CTD-II contiene en su extremo C-terminal un dominio de dimerización (Figura 1.13C). Dentro de este grupo encontramos a DnaJ de *E. coli*, Ydj1 de *Saccharomyces cerevisiae* y DnaJA1, 2, 3 y 4 de humanos.

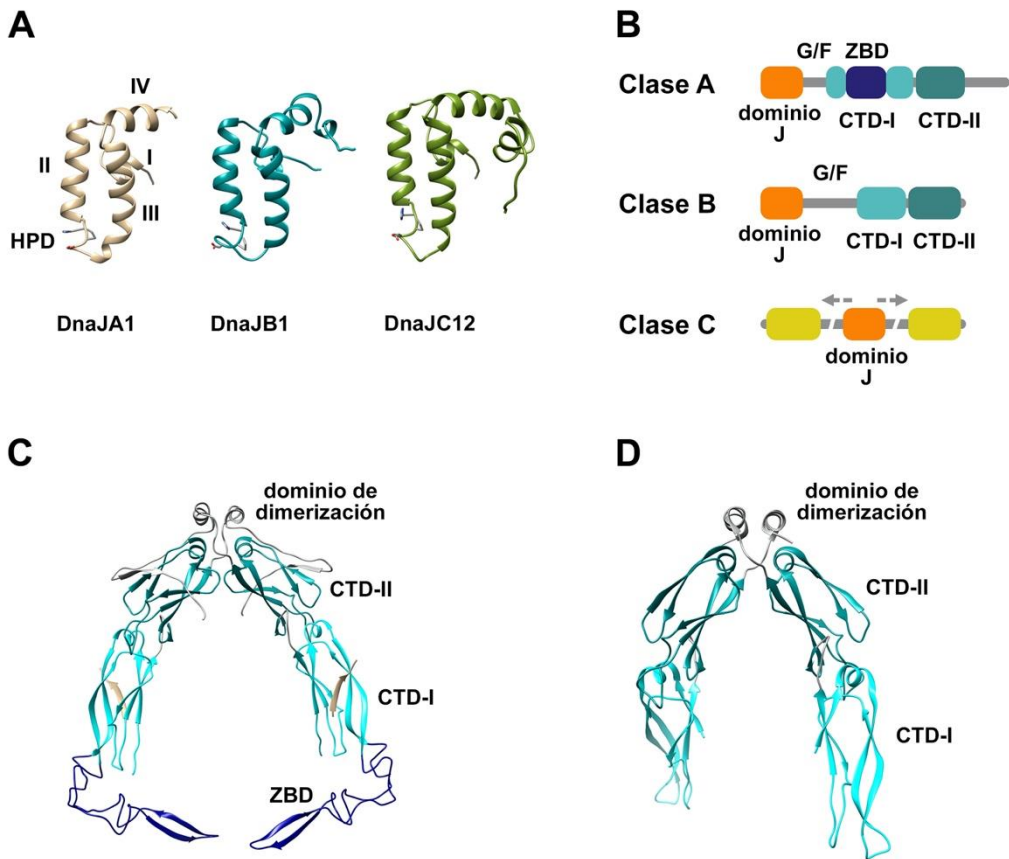


Figura 1.13: Proteínas JDP. **A**, estructura del dominio J de DnaJA1 (PDB ID 2m6y), DnaJB2 (PDB ID 1hdj) y DnaJC12 (PDB ID 2ctq) humanas pertenecientes a las Clases A, B y C, respectivamente. Se muestran las cadenas laterales del motivo HPD de cada una de las proteínas. **B**, representación esquemática de las diferentes clases en las que se agrupan las JDPs. **C**, estructura de los dominios ZBD, CTD-I, CTD-II y de dimerización de Ydj1, una Hsp40 de Clase A de *S. cerevisiae*. Reconstrucción realizada combinando los PDBs 1nlt y 1xao). **D**, estructura de los dominios CTD-I, CTD-II y de dimerización de DnaJB2 humana (PBD ID 3agy).

- **Clase B (o Tipo II):** presentan una arquitectura de dominios homologa a la de la clase A, a pesar de que la conservación de secuencia es baja, ya que se componen de un dominio J N-terminal, el dominio G/F, los dominios C-terminales CTD-I y CTD-II y el dominio de dimerización, sin embargo, carecen

del ZBD (Figura 1.13D). Entre las chaperonas de este grupo se encuentra CbpA de *E. coli*, Sis1 de levadura y DnaJB1, 2, 4, 5 y 11 en humanos.

- **Clase C (o Tipo III):** las JDPs de este grupo solo comparten con DnaJ la presencia del dominio J, que además puede estar localizado en cualquier posición de su secuencia. Se trata de un grupo de proteínas muy heterogéneo y diverso que pueden presentar diferentes tipos de dominios y motivos funcionales o estructurales, como hélices transmembrana, repeticiones de tetratricopéptidos, sitios de unión a GTP, dominios tioredoxina o kinasa, etc. (Kampinga y Craig 2010).

La mayoría de los componentes de la Clase A y algunos miembros de la Clase B actúan como chaperonas Hsp40 canónicas capaces de interactuar con sustratos proteicos y de transferirlos a Hsp70 por un mecanismo poco conocido (Baaklini et al. 2012). El dominio CTD-I de JDPs de ambas clases contiene un bolsillo hidrofóbico capaz de unir péptidos hidrofóbicos (Kampinga et al. 2019; Lee et al. 2002; Li et al. 2003; Yu et al. 2015) Además, los dominios G/F y ZBD pueden estar involucrados en la interacción con sustratos proteicos (Linke et al. 2003; Perales-Calvo et al. 2010). Aunque se desconoce la función específica que se esconde tras la homodimerización de las JDPs de Clase A y B, se ha descrito que es clave para la nucleación de complejos entre las Hsp40 y las Hsp70 en la superficie de los agregados proteicos (Nillegoda et al. 2015).

Dentro de la Clase C, existen proteínas que pueden interactuar con sustratos, pero generalmente sus interactomas son reducidos o, incluso, únicos como por ejemplo en el caso de la auxilina, o DnaJC6, que se une a clatrina (Sousa et al. 2016). En otros casos, las JDPs de esta familia no se asocian a sustratos y sirven para localizar una Hsp70 en un sitio particular de un compartimiento celular. Algunos ejemplos son: DnaJC2 (Zuo1 de levaduras) que recluta a Hsc70 a los ribosomas (Gautschi et al. 2001), la proteína mitocondrial DnaJC19, también llamada Tim14, que recluta a la Hsp70 mitocondrial (HspA9) a los sitios de translocación de proteínas a la matriz mitocondrial, y DnaJC23 (Sec63) un componente del translocón del retículo endoplásmico que se asocia a HspA5 (Bip) en el lumen para la translocación de proteínas (Craig 2018).

La unión de sustratos a las JDPs tiene una importancia crucial ya que inicia el ciclo funcional del sistema Hsp70 (Figura 1.11). La habilidad de las Hsp40 para reconocer los fragmentos hidrofóbicos de los sustratos no nativos les permite establecer los contactos iniciales con la proteína sustrato, permitiendo después la transferencia de

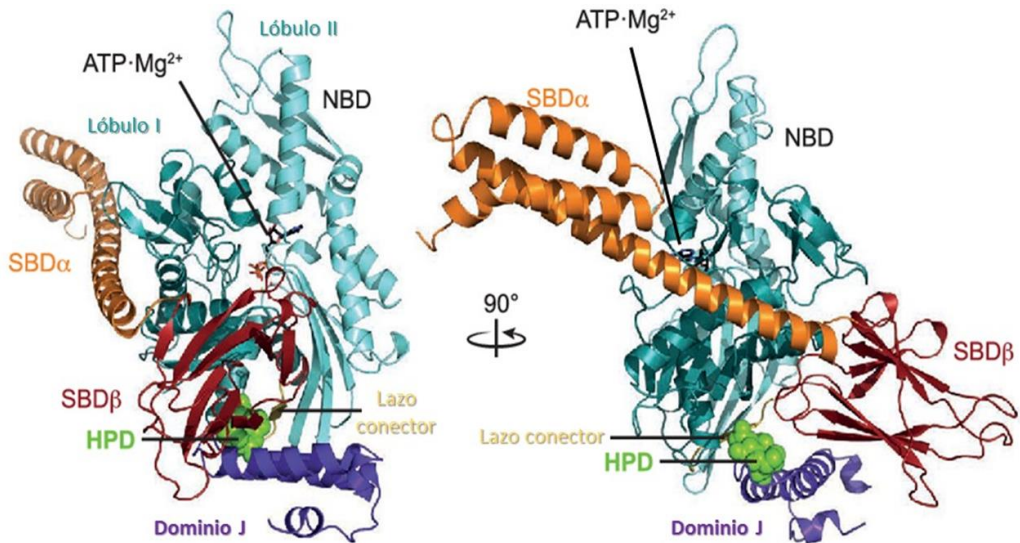
éste a Hsp70, bien por un incremento de la afinidad por los sitios de unión o por un incremento en el número de sitios (Misselwitz et al. 1998; Suzuki et al. 2012). Además, la interacción de un sustrato con una Hsp40 puede inducir cambios conformacionales en este (Rodríguez et al. 2008), que podrían facilitar la unión de Hsp70.

1.4.2.2.- Interacción con Hsp70.

Numerosos datos bioquímicos sugieren que la unión del dominio J de las Hsp40 al NBD de Hsp70 es esencial para la interacción entre ambas chaperonas (Kampinga et al. 2019; Kityk et al. 2018). La resolución de la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X del complejo entre DnaK y el dominio J de DnaJ de *E. coli* en presencia de ATP y Mg^{2+} ha sido de gran importancia para comprender la interacción y sus consecuencias funcionales (Kityk et al. 2018) (Figura 1.14).

En el complejo entre las dos proteínas, DnaK se encuentra en una conformación muy similar a la observada anteriormente para la proteína aislada en presencia de ATP y Mg^{2+} (Kityk et al. 2012)(ver Figura 1.11). El dominio J se une a DnaK en la zona formada entre el NBD y SBD β (Figura 1.14). Concretamente, el motivo HPD, conservado universalmente, se proyecta hacia el lazo conector de los dominios NBD y SBD de DnaK. Varios residuos de la hélice II establecen contactos hidrofóbicos con el conector y con el subdominio IIA (Kityk et al. 2018). Por otro lado, el motivo HPD y la hélice III interaccionan con residuos del SBD β de DnaK. Es importante mencionar que todos los residuos esenciales involucrados en estos contactos entre las proteínas de *E. coli* se conservan de bacterias a humanos, lo que sugiere que todos los dominios J interaccionan de forma similar con su respectiva Hsp70 (Kityk et al. 2018). Usando esta superficie de interacción, el dominio J puede detectar la ocupación del sitio de unión del sustrato y estimular concomitantemente la hidrólisis de ATP de forma eficaz.

Figura 1.14 (página siguiente): Unión del dominio J a Hsp70 en presencia de ATP y Mg^{2+} . Estructura del complejo entre DnaK unida a ATP y Mg^{2+} y el dominio J de DnaJ. Los dominios de DnaK se colorean según sigue: NBD en cian oscuro (lóbulo I) y cian claro (lóbulo II), lazo conector en amarillo, SBD β en rojo oscuro, SBD α en naranja. El dominio J de DnaJ se muestra en violeta (PDB ID 5NRO) y se destacan las cadenas laterales del motivo HPD en esferas verdes.



Aunque se ha descrito que la interacción con el dominio J es suficiente para estimular la actividad ATPasa de Hsp70, la formación del complejo entre ambas proteínas para llevar a cabo la transferencia y reactivación de polipéptidos desnaturalizados podría requerir interacciones adicionales que involucran la región G/F, el CTD-I y el ZFD (este último en las Hsp40 de tipo A). La región G/F, rica en residuos hidrofóbicos y situada cerca de la región de unión a sustrato de la proteína, podría participar en la interacción con dichos polipéptidos (Perales-Calvo et al. 2010). Por otro lado, el CTD-1 de Hdj1 parece ser esencial en la interacción con el dominio EEVD altamente conservado de Hsp70 (Yu et al. 2015), situado en el extremo C-terminal de esta última, importante en la regulación de la actividad de ambas chaperonas en el interior celular. Por último, la región ZFD I parece ser indispensable para la prevención de la agregación de diferentes sustratos en levadura y bacteria (Fan et al. 2005), y ZFD parece estar implicado en la transferencia de sustratos a Hsp70 (Baaklini et al. 2012).

1.4.3.- Apg2 humana y la familia de chaperonas Hsp110

Apg2 (HspH2 o HspA4) es una proteína citosólica y nuclear que pertenece a la familia de chaperonas Hsp110 en humanos. Otras tres proteínas forman parte de esta familia de chaperonas: Hsp105 (HspH1) y Apg1 (HspH3) ubicadas también en el citosol y núcleo, además de Grp170 (HspH4) que se localiza específicamente en el retículo endoplásmico (Kaneko, Kimura, et al. 1997; Kaneko, Nishiyama, et al. 1997; Matsumori et al. 2002; Steel et al. 2004). Hsp105 presenta además dos isoformas: Hsp105 α , la cual

se expresa de manera constitutiva en el citosol celular, y Hsp105 β que se expresa preferentemente en el núcleo celular (Saito et al. 2007, 2009). Mientras que Apg2, Hsp105 y Grp170 son ubicuas y se expresan en todos los tejidos, Apg1 se encuentra mayoritariamente en testículos, cerebro, riñón, hígado, pulmón y bazo (Vos et al. 2008). La expresión de estas proteínas se encuentra mucho más regulada que la de otras chaperonas como Hsp70 o Hsp40. Diversos estudios sugieren que en el citoplasma y en el retículo endoplásmico, la concentración de las Hsp110 es entre 7 y 14 veces inferior a la de Hsp70, respectivamente (Easton et al. 2000; Mattoo et al. 2013). De las tres Hsp110 citosólicas, solo la expresión de Hsp105 aumenta moderadamente bajo condiciones de estrés térmico (Hageman et al. 2011).

La función mejor conocida de las Hsp110s es la de actuar como intercambiadores de nucleótido de Hsp70, una actividad conservada de levaduras a humanos (Andréasson et al. 2008, 2010; Dragovic et al. 2006; Rampelt et al. 2012). Además, las tres Hsp110 citosólicas humanas sinergizan con Hsc70 y DnaJB1 en la reactivación de agregados proteicos *in vitro* (Rampelt et al. 2012), aunque la mayor parte de los estudios se han centrado en Apg2 (Gao et al. 2015; Nillegoda y Bukau 2015; Rampelt et al. 2012; Shorter 2011). Diferentes miembros de Hsp110 humanas co-localizan *in vivo* con EGFP-luciferasa en las mismas estructuras o compartimentos subcelulares (Rampelt et al. 2012). En ratones transgénicos, todas las isoformas de Hsp110 y Hsc70 se asocian de manera dependiente de la edad con oligómeros solubles e insolubles de G85R SOD1, un mutante de la superóxido dismutasa propenso al plegamiento incorrecto y vinculado al desarrollo de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Wang et al. 2009). Además, la adición exógena de Apg1 humana rescata la inhibición del transporte de vesículas anterógradas provocada por el mutante G85R SOD1 en axoplasmas de calamar (Song et al. 2013), y Hsp105 es capaz de suprimir la agregación de mutantes de SOD1 en células en cultivo (Yamashita et al. 2007). En un escenario relacionado, el knockout de Hsp110 en ratones provoca la acumulación dependiente de la edad de tau hiperfosforilada y la aparición de oligómeros neurofibrilares, ambos efectos relacionados con la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer (Eroglu et al. 2010). Asimismo, el silenciamiento por ARNi del único gen HSP110 de *C. elegans* promueve la acumulación de agregados de luciferasa y reduce el tiempo de vida de especímenes expuestos a choque térmico (Rampelt et al. 2012). En levaduras, la regulación de los estados priónicos [PSI⁺] y [URE3] es dependiente de la actividad chaperona de Sse1 (Fan et al. 2007; Kryndushkin y Wickner 2007; Sadlish et al. 2008), uno de los dos representantes de la familia Hsp110 en estos organismos. Por otro lado, la eliminación de Hsp105 aumenta la sensibilidad de células de mamíferos a varios tipos de estrés y dificulta el replegamiento de luciferasa desnaturalizada por calor. En células

humanas, Hsp105 facilita el plegamiento y el control de calidad del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), tanto en la etapa inicial durante su biosíntesis como en etapas posteriores de maduración postraduccional (Saxena et al. 2012). Curiosamente, Hsp105 estabiliza a $\Delta F508$ CFTR, el mutante más prevalente responsable de la fibrosis quística, lo que, a su vez, podría mejorar su expresión funcional superficial. Sse1 desempeña un papel esencial en el ensamblaje del huso mitótico mediante la modulación de la actividad del motor kinesin-5 Cin8 (Makhnevych et al. 2012). Además, Sse1p participa en la maduración de clientes del sistema de chaperonas Hsp70-Hsp90 en levaduras, contribuyendo a la determinación de promover el plegamiento o la degradación del sustrato (Mandal et al. 2010). Todos estos estudios revelan que las chaperonas Hsp110 son importantes en la gestión de los agregados proteicos en el interior celular y el mantenimiento de la homeostasis proteica, además de desempeñar posiblemente otras funciones especializadas.

1.4.3.1.- Estructura de las chaperonas Hsp110.

Las proteínas de la familia Hsp110 constituyen un brazo divergente de la gran familia de chaperonas Hsp70 (Easton et al. 2000; Lee-Yoon et al. 1995), presentando gran homología a nivel de secuencia y estructura (Oh et al. 1999; Schuermann et al. 2008). Al igual que las Hsp70, las Hsp110 se encuentran formadas por un dominio de unión a nucleótido (NBD), un dominio de unión a sustrato (SBD), dividido a su vez en subdominios α y β , y un lazo conector encargado de unir los dos dominios anteriores (Kityk et al. 2012; Liu y Hendrickson 2007; Polier et al. 2008; Schuermann et al. 2008) (Figura 1.15A). La comparación de las estructuras tridimensionales de Sse1 de *S. cerevisiae* y de DnaK de *E. coli* unida a ATP-Mg²⁺, obtenidas por cristalografía de rayos X (Kityk et al. 2012; Liu y Hendrickson 2007), revela la gran similitud estructural entre ambas familias de chaperonas (Figura 1.15B).

El alineamiento de las secuencias de algunos componentes de las familias Hsp70 y Hsp110 muestran la existencia de varias diferencias destacables (Figura 1.16). Las más importantes hacen referencia a la naturaleza del lazo conector que conecta los dominios NBD y SBD de la proteína, y a las dos inserciones en su secuencia con respecto a de las Hsp70. Por un lado, el lazo conector hidrofóbico de los dominios NBD y SBD, muy conservado entre las Hsp70, se reemplaza por una secuencia en la que se alternan los residuos polares e hidrofóbicos (Figura 1.16). A pesar de que esta secuencia adopta

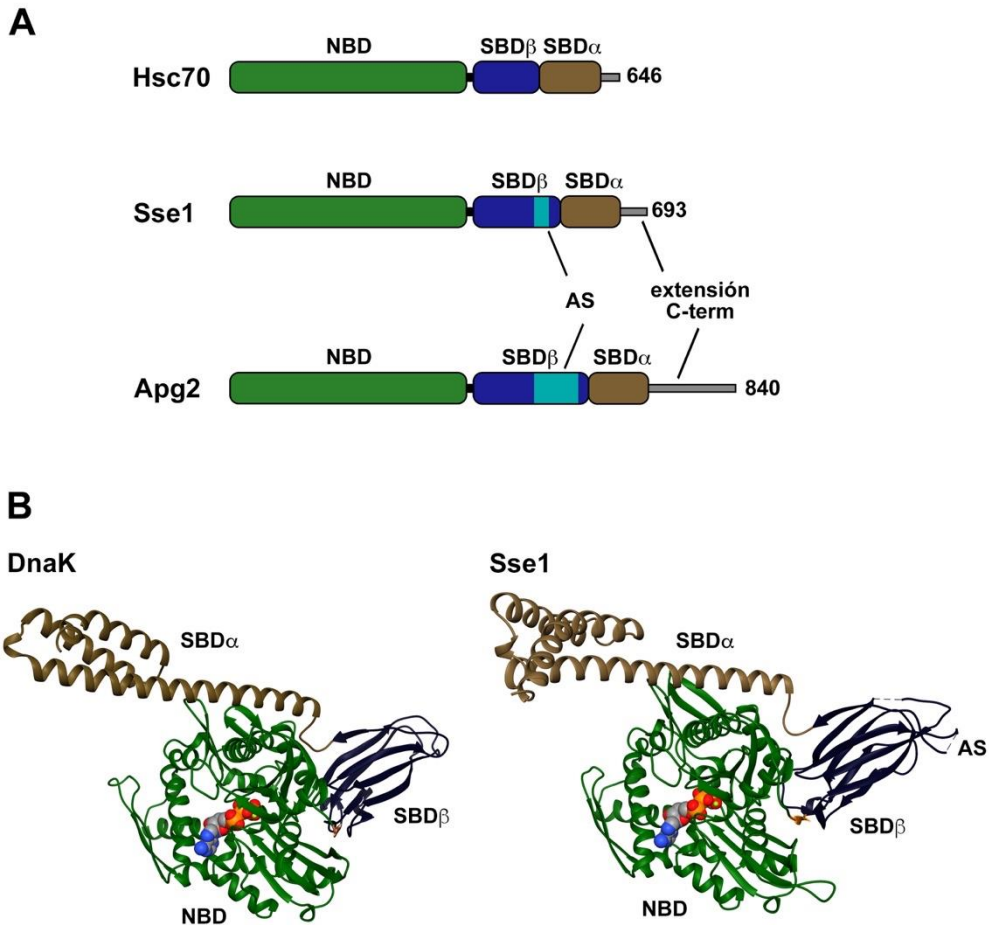


Figura 1.15: Distribución de dominios y estructura de las chaperonas de la familia Hsp110. **A**, representación esquemática de los dominios de las proteínas Sse1 de *S. cerevisiae* y Apg2 humana. **B**, estructura de DnaK de *E. coli* (PDB ID 4b9q) y Sse1 de *S. cerevisiae* (PDB ID 2qxl) unidas a ATP y Mg^{2+} . El nucleótido se muestra en esferas y los diferentes dominios en lazos: NBD (verde), lazo conector (naranja); SBD β (azul) y SBD α (marrón). Se indica la posición del subdominio ácido (AS), no resuelto de Sse1. Figura de Aguado et al. 2015.

una estructura de hoja β en Sse1 que se integra en el subdominio IIA del NBD, muy similar a la observada en DnaK (Figura 1.16B), se desconoce las implicaciones funcionales de la modificación de este lazo en las Hsp110. Se cree que el carácter polar de esta secuencia podría afectar a la comunicación alostérica entre los dominios SBD y NBD de la proteína, limitando de esta manera los cambios conformacionales

dependientes de nucleótido característicos del ciclo funcional de Hsp70 (Xu et al. 2012). Sin embargo, la unión a sustrato en el dominio SBD parece estar controlada por la unión a nucleótido en el NBD de la chaperona (Xu et al. 2012). De hecho, se ha descrito que el ciclo funcional de Hsp110 podría encontrarse regulado por la transmisión bidireccional a través de ambos subdominios, de pequeños cambios de entropía derivados de la unión al sustrato o al nucleótido, en el SBD o el NBD de la proteína, respectivamente (Stetz y Verkhivker 2015). Por otro lado, destaca la presencia de dos extensiones de la secuencia del SBD de las Hsp110 (Figuras 1.15A y 1.16C). La primera de ellas consiste en una inserción de una secuencia de longitud variable, poco conservada entre las distintas Hsp110, en el SBD β de la proteína (Figuras 1.15A y 1.16C). Esta secuencia presenta una densidad de carga negativa alta debido fundamentalmente a su alto contenido en residuos ácidos, por lo que se ha denominado como subdominio ácido, abreviado AS (de “acidic subdomain”) en esta Tesis. También se caracteriza por un contenido alto en prolinas y glutaminas en las Hsp110 humanas. Posiblemente se trate de un subdomino intrínsecamente desordenado cuando la proteína se encuentra en forma monomérica y en disolución, como se observa en la estructura tridimensional de Sse1 (Figura 1.14B). La segunda de las inserciones se sitúa en el extremo C-terminal de la proteína y consiste, en una extensión de éste (Figuras 1.15A y 1.16C). A diferencia de lo que ocurre para el AS, esta secuencia se encuentra bastante conservada entre las diferentes Hsp110 humanas especialmente en su parte inicial (Figura 1.16C).

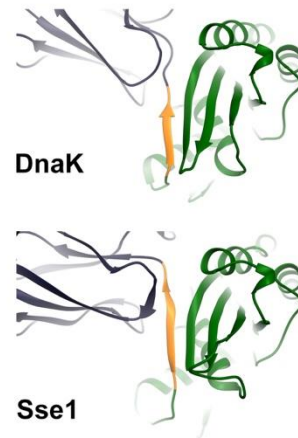
Figura 1.16 (página siguiente): Alineamiento de secuencias de miembros de las familias de chaperonas Hsp70 y Hsp110. A, alineamiento de la secuencia del lazo conector entre los dominios NBD y SBD de DnaK de *E. coli*, Hsc70 (HspA8), Hsp70 (HspA1A), Hsp105 (HspH1), Apg1 (HspH3) y Apg2 (HspH2) humanas y Sse1 de *S. cerevisiae*. La numeración corresponde a DnaK y Sse1. **B**, comparación de la estructura del lazo conector (en naranja) de DnaK de *E. coli* (PDB ID 4b9q) y Sse1 de *S. cerevisiae* (PDB ID 2qxl) en la conformación unida a ATP y Mg²⁺. El NBD y SBD de las dos proteínas están coloreados en verde y azul, respectivamente. **C**, alineamiento de la secuencia correspondiente al SBD completo de las proteínas en A. Los residuos idénticos entre todas las proteínas se colorean en verde en A y en C, mientras que los residuos conservados solo en las Hsp110 se muestran en cian y gris. Los elementos de estructura secundaria de DnaK y Sse1 en la conformación unida a ATP se indican mediante flechas azules (cadenas β) y rectángulos marrones (hélices α). Los alineamientos se realizaron con Clustal Omega.

A

```

DnaK_EC      VKDVL388LLLDVTPL
Hsc70_HS    VQDLLLLLDVTPL
Hsp70_HS    VQDLLLLLDVAPL
Hsp105_HS   VREFSVTDAVPF
Apg1_HS     VREFSITDLVPY
Apg2_HS     VREFSITDVVPY
Sse1p_SC    VRPFKFEDIHPY
                392       399
    
```

B



C

```

DnaK_EC      PLSLGIET-----MGGVMTLAKNNTIIPKHSVMSAEADNQSANTHVLQGERKR-AADNKS LGQFNLDGINPAPRGM-PG 471
Hsc70_HS    PLSLGIET-----AGGVMTVLIKRNTIIPKQOTPTTYSNDNPGVLIQVYEGERAN-TKDNLLLGKFEITGIPAPRGM-PG 473
Hsp70_HS    PLSLGIET-----AGGVMTALIKRNTIIPKQOTPTTYSNDNPGVLIQVYEGERAN-TKDNLLLGKFEISGIPAPRGM-PG 473
Hsp105_HS   PFPISLILWNHDSIEDTEGVHEVVF-SRNHAAPFSKVLTELRGPF---FELEAFYSDPQGVPYPE-AKIGRFVVOVNSAOKDGEKSR 477
Apg1_HS     PYSITLRWKTSEFDGSGECEVF-CKNHPAPFSKVLTELRGPF---FELEAFYTNLHVEVPYP-ARIGSFITONVFDOSDGSSSK 477
Apg2_HS     PYPISLRWNSPAEAGSSDCEVF-SKNHAAPFSKVLTEYRKEP---FTLEAYSSPQDLPPYP-PAIAQFVSKVQVTEOSDGSSSK 477
Sse1p_SC    PYSVSVKWDKQVDE-DHMEVF-PAGSSEFSTKLIILNRTGD---FSMAASYTDITQLPNTPEQIANTWEITVQVPEGQDSVP 477

DnaK_EC      LEVTFDIDADGILHVSADKN----- 492
Hsc70_HS    LEVTFDIDANGILNVSVDKS----- 494
Hsp70_HS    LEVTFDIDANGILNVTIDKS----- 494
Hsp105_HS   VKVKVRVNTHGIFTISTASMVKVPTEENE-----MSSEADMVCLNQRPPENPTDKNVQODNSEAGTQPOVOTDAQTSQSP 556
Apg1_HS     VKVKVRVNIHGIFSVASASVIEKONLEGDHS---DAPMETETSEFK---NENKDNMDKMQVDQEEGHQKCHAEH---TP 546
Apg2_HS     VKVKVRVNVHGIQFVSSASLVEVHKSEENE---EPMETDQNAKEE---EKMQVDQ---EEPHVEEQOQ---QTPA 540
Sse1p_SC    VKLKLRCDPSSGLHTEIEEAYTIEIVEEPIPLPEDADAEQEF----- 521

DnaK_EC      -----SGKE--OKITIKA-SSG-INEDEIQKIVRDAEANAEDRNFELVQTRNOGDH 541
Hsc70_HS    -----TGKE--NKITITN-DKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDKORDKVSSKNLSLES 544
Hsp70_HS    -----TGNA--NKITITN-DKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDVORRERVSANKNALES 544
Hsp105_HS   SPFLTSEENKIPDADKANEKKVQPPPAKKPKIKVNVNVLPLEANIVMOLGKDLNLMYIETEGKMIIMODKLEKERNDARNAVEE 640
Apg1_HS     EEEIDHTGAKTKSAVSDKQDRLN---QTLKKGAVKSIDLPIQSSLCROLGODLLNSYIENEGKMIIMODKLEKERNDARNAVEE 626
Apg2_HS     ENKAESE-EMETSQAGSKDKKMDOPPQAKKAKVITSTVDLPENQLLWIDREMLNLYIENEGKMIIMODKLEKERNDARNAVEE 623
Sse1p_SC    -----KKVTKTKVKKDDLTIV-AHTFGIDAKKLNELIEKENEMLAQDKLVAETEDRKNTEEE 576

DnaK_EC      LLHSTRKQVFEAGD---KLPADDRTAIESALTALETAI---K-GEDKAAIFAKMOELAVSOKLMEIAQQOHAQO---QTAGADA 616
Hsc70_HS   YAFNMKATVEDKLGKQKINDEDKQKILDKCNSEIINWLDKNQ-TAEKEEFHQKLEKVCNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFP 627
Hsp70_HS   YAFNMKSAVEDEGLGKGISEADKVKVLDKQCEVLSWLDANT-LAEKDFEFHRKLEQVCNPIISGLYQAGGPG---PGGFG- 623
Hsp105_HS   VVYEFRDKLCGPVE-KFICEODHONFLRLLETEDWLYEGEDQAKQAVYDKLEELMKIGTFVVKVFOEAERFPK-----MFEE 718
Apg1_HS     VVYDFRDLRTGVVE-KFTPEDELKLSAVLEDTENWLYEDGEDQPKQVYVDKLOELKKYQOPQMKMYMEHEERPK-----ALND 704
Apg2_HS     VVYEMRDKLSGEVE-KFVSEDDRNSTFLKLEDTENWLYEDGEDQPKQVYVDKLAELKNLGQPKIRIFQSEERPK-----LFEE 701
Sse1p_SC    VIYTLRGLKLEEVA-PFASDAEKTKLQGLNKAEEWLYDEGFDSIRAKYIAKYEELASLGNIRGRYLAKEEEEK-----QAIR 654

DnaK_EC      SANNAKDDDVVDAEF-----EEVKDKK----- 638
Hsc70_HS    GGAPFSGGASSGPTI-----EEVD----- 646
Hsp70_HS    -AGGPKGSGSGPTI-----EEVD----- 641
Hsp105_HS   LQORLQHYAKIAADE-----RNKDEKYNHIDSEMKKVEKSVNEVMEWMNNVMNAQAACKSLDQDPVVRQAEIKTKIKELNN 794
Apg1_HS     LGKKIQLVMKVIEAY-----RNKDERYDHLDPTEMEKVEKCSIDAMSWLNSKMNQAQNKLSLTQDPVVRVSEIVAKSKELDN 780
Apg2_HS     LGKIQIQYMKIISSE-----KNKEDQYDHLDAADMTKVEKSTNEAMEWMNNKLNQNKQSLTMDPVRVSKETIARTIKELTS 777
Sse1p_SC    SKQEAASQMAAMAELKLAQRKAEAEKKEEKDTEGVDVMD----- 693

DnaK_EC      ----- 638
Hsc70_HS    ----- 646
Hsp70_HS    ----- 641
Hsp105_HS   TCEPVVTPQPKPIESFKLERTP-NGPNIDKKEEDLEDKNVFGAEPHPQN-GECPFN---EKNSVNMDDL 858
Apg1_HS     FCNPITLYKPKRAEVPEDKPKANSEHNGFMDGQSGTETKSDSTK-----DSSQHTKSSGEMEVD 839
Apg2_HS     TCSPIISKPKPKVEPPKKEEOKN-AEQNGFVDG-----QGDNPQQAEEQGTDTAVPSDSDKLPPEMID 840
Sse1p_SC    ----- 693
    
```

Hasta el momento se desconoce con precisión cuáles son las funciones específicas de estas dos regiones que diferencian a las Hsp110 de sus homólogas Hsp70. Tanto el AS como el dominio C-terminal están implicados en la localización correcta entre citoplasma y núcleo de las isoformas α y β de Hsp105, respectivamente (Saito et al. 2007, 2009). Una construcción que carece de los últimos 19 residuos del dominio C-terminal de Sse1p tiene una actividad de intercambio de nucleótidos reducida (Dragovic et al. 2006). Sin embargo, la eliminación de los últimos 44 de esta proteína no elimina la capacidad de conferir resistencia térmica a células de levadura (Shaner et al. 2004). Por otro lado, la eliminación del AS en Hsp105 humana no modifica significativamente a su capacidad para prevenir la agregación de un sustrato proteico, sin embargo, reduce la actividad replegadora del sustrato desplegado unido a Hsp105 por el sistema de chaperonas completo (Oh et al. 1999). De acuerdo con estos datos, una deleción similar en Sse1p disminuye ligeramente la tasa de replegamiento de un sustrato mantenido en una conformación competente de ser plegado, sin modificar la interacción con Ssa1p y la actividad de intercambio de nucleótidos (Polier et al. 2008). Finalmente, es importante destacar que, aunque las dos regiones divergentes están presentes tanto en Hsp110 de levaduras como en proteínas Hsp110 de origen humano (y, en general, otros animales), éstas contienen un número de residuos significativamente mayor (Figura 1.16C).

1.4.3.2.- Ciclo funcional de Hsp110, hidrólisis de ATP e interacción con sustratos.

El ciclo funcional de las Hsp110 se ha caracterizado mucho menos que el de las Hsp70. A pesar de la estrecha relación que las Hsp110 guardan con las Hsp70, los datos publicados hasta la fecha indican que presentan un ciclo funcional diferente. Como se ha desarrollado en el punto 1.4.1.4, la funcionalidad de las Hsp70 está basada en la alternancia de dos conformaciones marcadamente diferentes: una unida a ATP y otra unida a ADP, con baja y alta afinidad por sustratos proteicos, respectivamente. Los ciclos a través de estas conformaciones dependen de la comunicación alostérica entre los dominios NBD y SBD que responde a la unión e hidrólisis de ATP y sustratos proteicos. Al igual que las Hsp70, las Hsp110 son capaces de unir e hidrolizar ATP con velocidades similares a las Hsp70 (Raviol et al. 2006). Asimismo, son capaces de interactuar con sustratos proteicos y protegerlos de la agregación (Goeckeler et al. 2002, 2008; Mattoo et al. 2013; Oh et al. 1997; Wu et al. 2012). En presencia de ATP, la afinidad de Sse1 por un péptido se ve reducida considerablemente (Xu et al. 2012), lo que puede indicar la existencia de acoplamiento alostérico entre NBD y SBD. Sin embargo, esta reducción de afinidad por un péptido no es tan significativa para Hsp110 humana (Xu et al. 2012), y, por otro lado, la unión de los clientes no estimula la hidrólisis de ATP en Sse1 y Apg2 (Goeckeler et al. 2008; Raviol et al. 2006). Diferentes ensayos

directos, como tripsinolisis controlada (Raviol et al. 2006) e intercambio de protón de amida acoplado a espectrometría de masas (Andréasson et al. 2008), no muestran diferencias conformacionales significativas entre los estados unidos a ATP o ADP de varias Hsp110. Estas evidencias sugieren que, si las Hsp110 poseen un mecanismo alostérico de comunicación entre NBD y SBD, este no resulta en cambios conformacionales marcados tras la unión e hidrólisis de ATP al igual que en las Hsp70.

1.4.3.3.- Interacción con Hsp70 e intercambio de nucleótido.

La estructura del complejo entre Hsp110 y Hsp70 ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X por dos grupos distintos empleando, por un lado, Sse1 y el NBD de Ssa1 de levaduras (Polier et al. 2008) y, por otro, Sse1 y un mutante de Hsc70 bovina con un SBD α parcialmente truncado (Schuermann et al. 2008). En conjunto, ambas estructuras son muy similares y muestran como las interacciones más importantes se producen entre los NBDs de ambas proteínas, que se enfrentan entre sí asimétricamente cara a cara (Figura 1.17 A y B), de modo que se generan contactos entre los subdominios IIB y IB, IIA y IA, y IB y IIB de Sse1 y las dos Hsp70s, respectivamente. Sse1p se encuentra unida a ATP en la primera estructura del complejo y a ADP·BeFx, un complejo organometálico conocido por imitar los efectos del ATP (Fei et al. 2014; Ponomarev et al. 1995), en la segunda. La conformación de Sse1p es similar a la que posee en solitario (Figura 1.15B), lo que está de acuerdo con la falta de grandes cambios conformacionales observada por otras técnicas tras la unión de nucleótidos, como se menciona anteriormente.

Los mayores cambios en Sse1 aparecen en su SBD α , que interactúa con el lóbulo II del NBD de Hsp70 (Figura 1.17C y D). En la estructura publicada por Schuermann y colaboradores se observa como el SBD de Hsp70 se posiciona en proximidad del SBD β y el AS de Hsp110 (Figura 1.17B). Este último establece contactos con el NBD y el SDB de Hsp70 del complejo contiguo en la unidad cristalina, lo que provoca el ordenamiento de este segmento de la proteína (Figura 1.17B). Aunque es posible que este efecto sea un artefacto debido al empaquetamiento cristalino, no se descarta que pueda jugar un rol funcional (Schuermann et al. 2008).

En cuanto a Hsp70, el NBD se encuentra en estado apo en una de las estructuras (Polier et al. 2008) (Figura 1.17C), mientras que en la otra está unido a ADP (Schuermann et al. 2008) (Figura 1.17D). Posiblemente, este segundo complejo Hsp110:Hsp70 capture un estado “pre liberación” del ADP, en el que Sse1p induce la apertura del NBD de Hsc70,

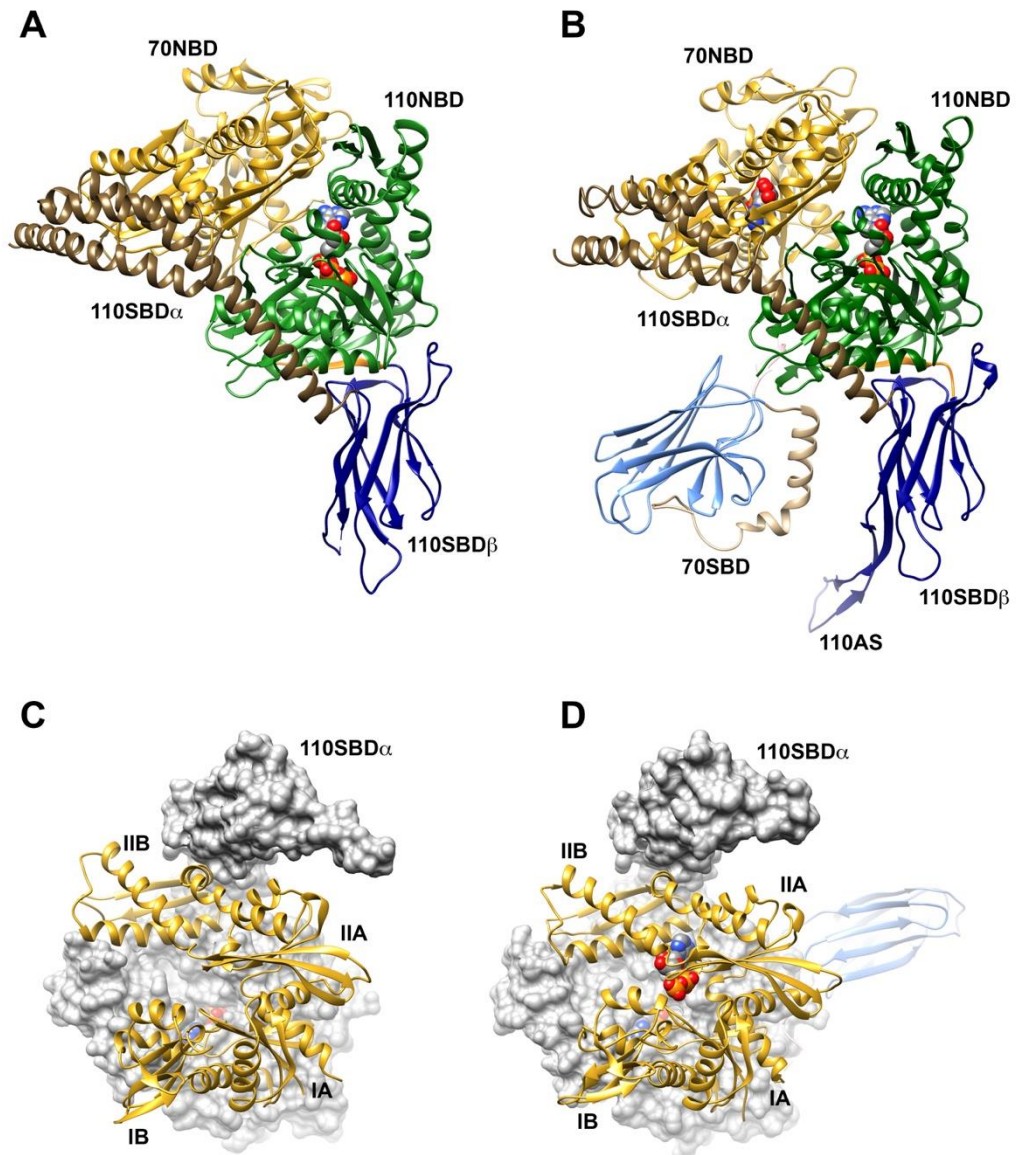


Figura 1.17 (página siguiente): Estructura del complejo Hsp110:Hsp70. A, representación en lazos de la estructura de Sse1 en complejo con el NBD de Ssa1 en amarillo (PDB ID 3d2e). Los diferentes dominios de Sse1p se muestran en: verde, NBD; azul, SBD β ; marrón, SBD α . El ATP unido a Sse1 se muestra en esferas. **B,** estructura de Sse1 en complejo con Hsc70 bovina (PDB ID 3c7n). El NBD de Hsc70 se representa en amarillo y el SBD en azul y marrón. Sse1 y los nucleótidos se muestran como en A. **C y D,** vista frontal del NBD de Ssa1 y Hsc70, respectivamente. La superficie de Sse1 se muestra en gris.

pero el nucleótido todavía no ha sido expulsado (Schuermann et al. 2008). Es interesante también que Hsp70 establece contactos con el bolsillo de unión a nucleótido de Sse1p, e incluso con el grupo adenina del ATP unido a ésta (Polier et al. 2008), lo que podría explicar en parte la necesidad de que esta última requiera la unión de ATP para formar el complejo (Shaner et al. 2006). La comparación de la estructura del NBD de Hsp70 libre unido a ADP con la del estado “pre liberación” unido a ADP y la del estado apo, ambas en complejo con Hsp110, revela que la interacción con ésta provoca fundamentalmente cambios conformacionales que afectan al subdominio IIB de Hsp70 (Figura 1.18). Así, este subdominio de Hsp70 queda atrapado entre el SBD α y el flanco del lóbulo IIB del NBD de Sse1p, lo que promueve la rotación de 27 $^\circ$ hacia afuera con respecto al resto del NBD. En esta conformación, los sitios de unión del lóbulo II para la adenosina y los residuos catalíticos y de unión al trifosfato del lóbulo I de Hsp70 quedan separados, disminuyendo de esta manera la afinidad por el nucleótido y facilitando por lo tanto su liberación. Una vez formado el complejo, este queda atrapado cinéticamente y el nucleótido puede eliminarse sin comprometer la estabilidad del mismo (Andréasson et al. 2008).

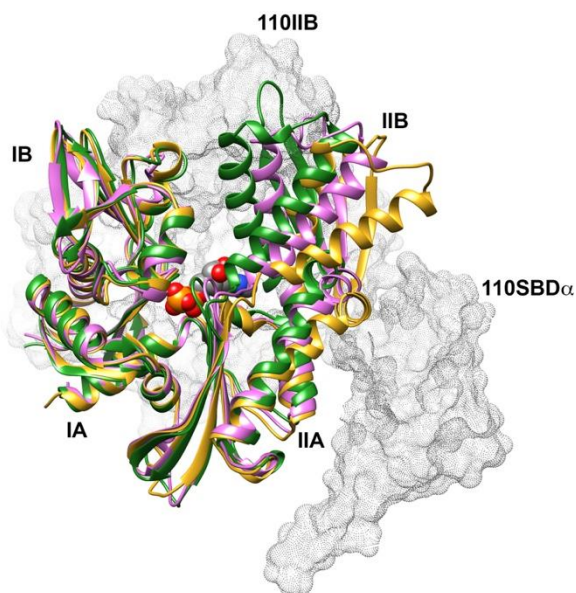


Figura 1.18: Diferencias estructurales en el NBD de Hsp70 libre o en complejo con Hsp110. Superposición de la estructura de los NBDs de: Hsc70 bovina unida a ADP en lazos verdes (PDB ID 3hsc); Hsc70 bovina unida a ADP en lazos morados y en complejo con Sse1 (PDB ID 3c7n) (por claridad, no se muestran el ADP ni Sse1); Ssa1 apo en lazos amarillos y en complejo con Sse1 (PDB ID 3d2e) (la superficie de sse1 se muestra en puntos grises).

1.4.3.4.- El papel de Hsp110 en la reactivación de agregados proteicos.

Aún no se comprende completamente el rol preciso que las proteínas Hsp110 desempeñan en la reactivación de agregados proteicos en metazoos. Se ha observado que la interacción entre Apg2 y Hsc70 es esencial para que se de reactivación y que Apg2 juega un papel catalítico, dado que es especialmente eficaz a concentraciones subestequiométricas con respecto a Hsc70 (Rampelt et al. 2012). Además, la capacidad de potenciar la reactivación de agregados no depende de la actividad ATPasa de Apg2 (Rampelt et al. 2012), o la capacidad de Sse1 de unir sustratos proteicos (García et al. 2017). Estos hechos son compatibles con una actividad de Apg2 como factor de intercambio de nucleótidos de Hsc70.

A diferencia de estos resultados, Hsp105 α humana puede replegar agregados en colaboración con Hsp40 de una forma dependiente de ATP (Mattoo et al. 2013). Sin embargo, en este estudio se emplean cantidades estequiométricas de Hsp110 que para otros sustratos resultan inhibitorias (Rampelt et al. 2012). Esta contradicción está posiblemente relacionada en parte con el tipo de sustratos agregados empleados (Nillegoda y Bukau 2015). En cualquier caso, si la función de Hsp110 se limita a actuar como NEF, ¿por qué otras proteínas humanas con actividad NEF, como Bag1 (Rg et al. 1997), no pueden facilitar la reactivación de agregados proteicos (Rampelt et al. 2012)? Un factor importante es que se desconoce como Apg2, u otras Hsp110, interacciona con los agregados y si la interacción con los sustratos extraídos es necesaria durante el replegamiento. Es posible que el proceso de reactivación de agregados requiera la actividad chaperona de Apg2. Otra posibilidad para explicar el papel exclusivo de Hsp110 en la actividad desagregasa es que la arquitectura del complejo formado por las chaperonas en la superficie del agregado podría permitir preferentemente la interacción de Hsp110 con Hsp70, imponiendo restricciones estéricas sobre otras proteínas NEF (Nillegoda y Bukau 2015).

Finalmente, es importante destacar aquí que el sistema de levadura formado por Ssa1 (Hsp70), Ydj1 (Hsp40) y Sse1 (Hsp110), homólogo a la combinación de Hsc70/DnaJB1/Apg2 humanas, tiene una actividad desagregasa prácticamente nula (Rampelt et al. 2012). Así, la pregunta que subyace es ¿qué diferencia a Apg2 humana y Sse1 de levadura? Nuestros análisis de la secuencia y la estructura, mostrados en el apartado 4.3.1, revelan que las mayores diferencias se encuentran en el AS y la extensión C-terminal de la proteína. Es, por tanto, de especial interés caracterizar el papel de estos dominios divergentes en la actividad de Apg2 y como contribuyen al proceso de reactivación de agregados proteicos por el sistema Hsc70.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en la presente Tesis son:

- 1.- Estudiar el papel de Apg2 (HspH2) humana en la regulación de la actividad chaperona de Hsc70 (HspA8), en especial en el proceso de reactivación de agregados proteicos.
- 2.- Determinar el efecto de los dominios divergentes de Apg2 (AS y la extensión C-terminal) en la formación del complejo con Hsc70.
- 3.- Caracterizar la función desempeñada por los dominios divergentes de Apg2 en la actividad replegadora del sistema de chaperonas.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES.

3.1.1. Cepas bacterianas.

En la siguiente tabla se resumen las cepas de *E. coli* utilizadas en esta Tesis.

Tabla 3.1. Cepas derivadas de *E. coli* empleadas en esta Tesis para la sobreexpresión de proteínas.

CEPA	GENOTÍPO	REFERENCIA
<i>DH5α</i>	<i>F- supE44 DlacU169(f80lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Grant et al. 1990)
<i>XL1-Blue</i>	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rK-mK+)</i>	(Bullock WO et al. 1987)
<i>BL21 (DE3)</i>	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3)</i>	(Studier y Moffatt 1986)
<i>BL21 CodonPlus (DE3) RIPL</i>	<i>F-ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr galλ(DE3) endA Hte [argU proL Camr] [argU ileY leuW Strep/Specr]</i>	Stratagene
<i>Rosetta (DE3)pLysS</i>	<i>F ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam^R)</i>	(Novy et al. 2001)

***XL1-Blue* y *DH5α*:** En estas cepas han sido desactivados los genes que degradan ADN no metilado como, por ejemplo, los productos de PCR. También carecen de otras enzimas como las endonucleasas. Estas características les proporcionan la habilidad de aceptar ADN exógeno con mayor eficacia, por lo que son cepas comúnmente empleadas en las transformaciones.

***BL21(DE3)*:** Esta cepa utiliza la polimerasa del fago T7 para la sobreexpresión de grandes cantidades de proteína recombinante codificadas en plásmidos con promotores de este fago. La cepa lleva insertado el lisógeno del fago λ DE3 cuyo gen *int* está interrumpido por el gen *lacI*, el promotor *lacUV5*, el inicio del gen *lacZ* y el gen de la RNA polimerasa del fago T7.

***BL21 Rosetta(DE3) pLysS*:** A parte de contener las características propias de BL21 (DE3), esta cepa está diseñada para mejorar la expresión de proteínas eucariotas, ya que

contiene ARNt para codones poco comunes en *E. coli* (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, CGA). Además, expresan la lisozima de T7, un inhibidor de la T7 RNA polimerasa que previene su expresión basal en cultivos no inducidos con IPTG.

BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL: Al igual que las Rosetta, contiene tRNAs para codones poco comunes en *E. coli* (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC). Contienen también las características de la cepa BL21(DE3).

3.1.2. Medios de cultivo, selección y conservación.

Los cultivos líquidos se realizaron en el medio Luria-Bertani (LB) (Mamiatis et al. 1985) (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro de cultivo) (LB broth, Miller. Sigma-Aldrich). Para obtener medios de cultivo selectivos se añadieron los antibióticos sobre el LB previamente autoclavado a 120°C durante 20 min: ampicilina a 100 µg/ml y cloranfenicol a 35 µg/ml (solo para BL21 Rosetta (DE3) pLys y BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL). La sobreexpresión de las proteínas clonadas se indujo añadiendo la concentración adecuada de IPTG en cada caso.

Los cultivos en medio sólido se realizaron sobre medio LB-Agar (medio LB con un 2% (p/v) de agar) (Agar. Sigma-Aldrich) al cual tras ser autoclavado, se le añadieron los antibióticos a las mismas concentraciones que para los cultivos líquidos, para finalmente dejarlo enfriar y solidificar.

Todas las cepas empleadas se conservaron en glicerol al 40 % (v/v) a -80 °C. Para ello, se resuspendió 1 ml de cultivo saturado (crecido durante toda la noche) en 1 ml de glicerol al 80 % (v/v).

3.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Gran parte de las proteínas utilizadas en este trabajo se han obtenido mediante técnicas de Biología Molecular. Estas técnicas permiten la extracción, manipulación y modificación del ADN codificante (cADN) de las proteínas de interés, para su posterior introducción en células, en nuestro caso *E. coli*, para su sobreexpresión y purificación.

3.2.1. Extracción del ADN plasmídico

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico, circulares y de pequeño tamaño presentes normalmente en especies bacterianas, que se caracterizan por replicarse y transmitirse de forma independiente al ADN cromosómico. Tienen su propio origen de replicación y no son necesarios para la viabilidad celular. Además,

pueden contener genes que permiten su auto transferencia entre células por conjugación bacteriana, y/o que confieren a la célula capacidad para sobrevivir bajo condiciones especiales como, por ejemplo, genes que confieren resistencia a determinados antibióticos.

Para la extracción del ADN plasmídico, se empleó el *kit* comercial *ATP™ Plasmid Midi Kit* (ATPbiotech Inc, Teipei, Taiwan). Este *kit* permite la extracción de ADN mediante un proceso de lisis alcalina y su posterior purificación mediante columnas de intercambio aniónico. Dependiendo de la cantidad y pureza requeridas en cada caso, se usaron las versiones MINI o MIDI, siguiendo para ello las instrucciones indicadas por el fabricante.

3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) permite clonar y amplificar rápidamente fragmentos pequeños de ADN. El método, desarrollado por Kary B. Mullis en 1983, por el cual se le concedió el Nobel de Química en 1993, supuso una revolución para la investigación biológica puesto que permitía la obtención *in vitro*, de una gran cantidad de copias de ADN a partir de fragmentos específicos del mismo. La idea es la utilización de un mecanismo similar al que tiene lugar en el interior celular para llevar a cabo la replicación de ADN: la doble hebra es separada para que la enzima ADN polimerasa pueda realizar una copia de cada hebra a partir de su extremo 3', usando para ello la hebra original como molde, dos oligonucleótidos cebadores que hibridan en los extremos del gen o fragmento del gen a amplificar y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). Todo ello llevado a cabo en un medio químico adecuado que asegure las condiciones óptimas para el buen desarrollo de la reacción enzimática. Para llevar a cabo el mismo proceso *in vitro*, la PCR tiene 3 fases (Figura 3.1):

1. **Desnaturalización:** se induce la separación de la doble hebra del ADN molde al elevar la temperatura a 90-95° C durante 30 segundos.
2. **Hibridación:** la temperatura desciende a una cercana a la temperatura de desnaturalización (T_m) de los cebadores para permitir su unión a las hebras del ADN molde separadas y evitar cualquier tipo de interacción inespecífica.
3. **Polimerización o elongación:** se aumento la temperatura a 72 °C para inducir la síntesis del ADN por la ADN polimerasa. Cada ciclo de PCR se completa en pocos minutos dependiendo de la longitud del fragmento a copiar y la velocidad de síntesis de la polimerasa (10^3 bases/min para PfuTurbo).

El resultado es la duplicación de la secuencia diana delimitada por la pareja de cebadores específicos utilizada. Puesto que cada nueva copia generada sirve también como molde para los siguientes ciclos, la replicación es exponencial. De esta manera,

al final de n ciclos, el número de copias de ADN por cada molécula será de 2^n , obteniéndose durante una reacción de PCR típica, millones de copias de ADN en menos de 3 horas. Las PCRs se realizaron en un termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hauppauge, NY, EEUU) según la tabla 3.3.

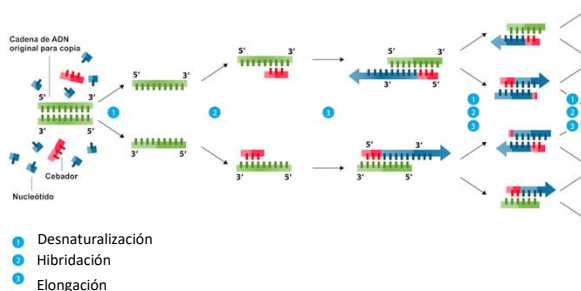


Figura 3.1: Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se detallan las tres principales fases que tienen lugar durante cada ciclo de replicación de las hebras de ADN.

Tabla 3.2. Cantidades de cada componente empleado para la PCR por cada 100 μ l de reacción

Componente	Concentración final	Especificaciones	Casa comercial
<i>PfuTurbo</i> DNA polimerasa	0,025 U/ μ l	Enzima polimerasa	Agilent
dNTPs	250 μ M de cada uno	Adenina, Guanina, Citosina y Timina	Sigma-Aldrich
Oligo R	0,5 μ M	Cebador para el extremo 3'	Eurofins
Oligo F	0,5 μ M	Cebador para el extremo 5'	Eurofins
DNA molde	1 ng/ μ l	Fragmento de DNA que se quiere amplificar	
10x PCR Buffer	1x	100 mM Tris-HCl, pH 8,3 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 0,01% gelatina	Agilent

3.2.2.1. Mutagénesis dirigida utilizando PCR.

La PCR es una técnica muy valiosa para la generación de proteínas mutantes mediante la modificación (adición, eliminación o sustitución puntual de nucleótidos) de sus ADN. En los últimos años, se han publicado diferentes estrategias diseñadas para optimizar el número de fases y el tiempo requerido para la inserción de estas mutaciones. En esta Tesis se ha llevado a cabo el método *Quickchange II Site Directed Mutagenesis* (Stratagene, La Jolla, California, EEUU) (Figura 3.2) para la generación de diferentes mutantes de sustitución de las chaperonas bajo estudio. Este método requiere la utilización de una pareja de oligonucleótidos cebadores que contienen la mutación deseada. La *Pfu Turbo ADN polimerasa* copia las dos cadenas de ADN utilizando estos oligonucleótidos, generando así los plásmidos que contienen dicha mutación. Estos plásmidos son mellados y por lo tanto no aptos como plantilla para posteriores replications, por lo que no pueden amplificarse. Por esta razón, este tipo de PCR es lineal y no exponencial, y la producción de ADN es relativamente baja. Después, la hebra parental de ADN es eliminada específicamente con el enzima de restricción *DpnI*, una endonucleasa que degrada ADN metilado o hemimetilado (5'-Gm₆ATC-3'). El producto de PCR obtenido es introducido finalmente en células *XL1-blue* o *DH5α* mediante electroporación, para su conservación y posterior extracción. Las mutaciones deseadas fueron comprobadas mediante secuenciación.

Los oligonucleótidos cebadores deben cumplir los siguientes requisitos:

- Ambos deben contener la mutación deseada y alinear en la misma secuencia de la cadena opuesta del plásmido.
- Deben incluir entre 25 y 45 bases, y una $T_m \geq 78^\circ\text{C}$. La utilización de cebadores de más de 45 bases podría generar estructuras secundarias que afectarían a la eficacia de la reacción. Para calcular dicha T_m , se emplea la siguiente ecuación:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{ desemparejamiento}$$

donde:

- N es la longitud del cebador en bases.
 - G y C son guaninas y citosinas, respectivamente
 - Los valores de % GC y % desemparejamiento son números enteros.
- La mutación deseada debe encontrarse en el medio del cebador, flanqueada por alrededor de 5 y 10 bases correctas a ambos lados de la misma.
 - Como mínimo, el contenido en CG debe ser del 40% y terminar con una o más bases C o G.

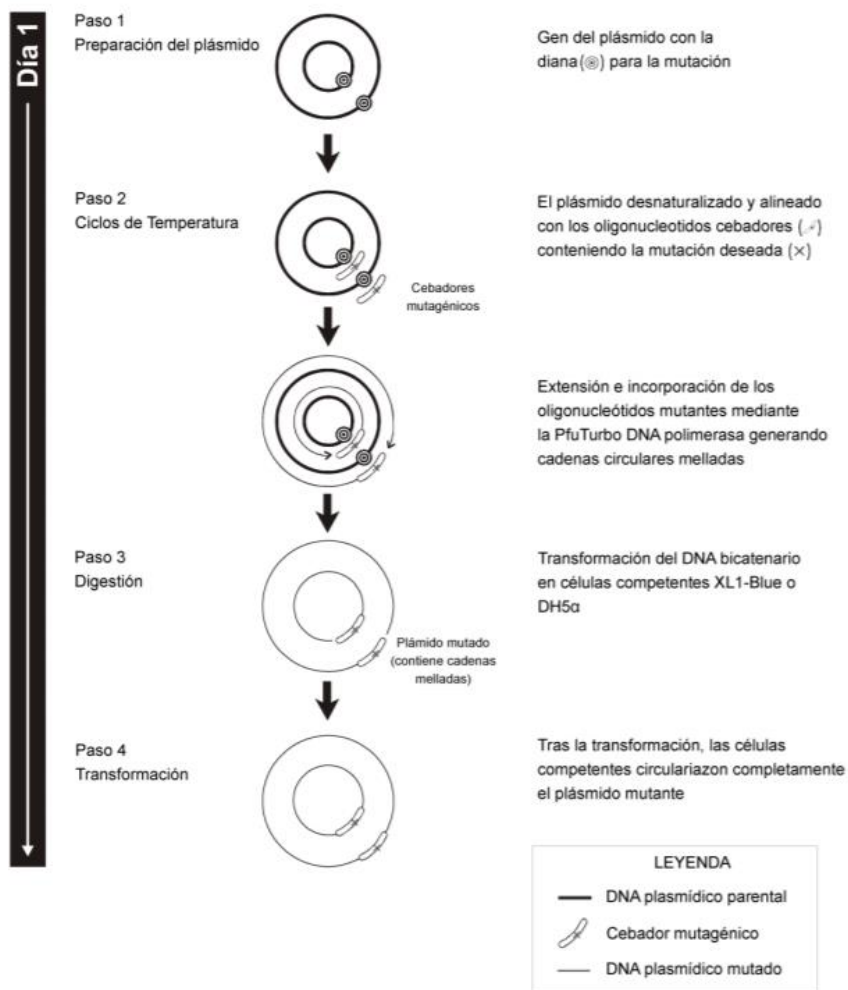


Figura 3.2: Esquema del método *Quickchange Site Directed Mutagenesis* (Stratagene, La Jolla, California, EEUU). Se llevó a cabo la estrategia de mutagénesis dirigida para el diseño de mutantes puntuales de varias de las proteínas clonadas en esta Tesis.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hamburg, Germany), según se especifica en la Tabla 3.4. Se realizó un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 4 minutos, tras el cual, se llevaron a cabo 15 ciclos compuestos por tres fases cada uno de ellos: fase de desnaturalización (95 °C, 1min), fase de hibridación (60°C, 1min) y fase de extensión o elongación (68 °C, 1min/kb). Una vez finalizado el proceso, la muestra se incubó a 4 °C. Las muestras resultantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (apartado 3.2.5.) y las que

contenían las bandas deseadas amplificadas, se trataron con *DpnI* a 37 °C durante 2h. Finalmente, se transformaron las células electrocompetentes con estos productos de PCR para su mantenimiento, y posterior purificación de las proteínas mutantes diseñadas.

Tabla 3.3. Cantidades de cada componente empleado para la PCR por cada 100 µl de reacción

Componente	Concentración final	Especificaciones	Casa comercial
<i>PfuTurbo</i> DNA polimerasa	0,04 U/µl	Enzima polimerasa	Agilent
dNTPs	250 µM de cada uno	Adenina, Guanina, Citosina y Timina	Sigma-Aldrich
Oligo R	0,5 µM	Cebador para el extremo 3'	Eurofins
Oligo F	0,5 µM	Cebador para el extremo 5'	Eurofins
DNA molde	0,2 ng/µl	Fragmento de DNA que se quiere mutar y amplificar	-
10x PCR Buffer	1x	100 mM Tris-HCl, pH 8,3 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 0,01% gelatina	Agilent

3.2.3. Digestiones de ADN con enzimas de restricción

Para realizar los clonajes de los mutantes empleados en esta Tesis, se emplearon endonucleasas de restricción obtenidos de New England Biolabs. Hertfordshire, Reino Unido. Los vectores y los genes amplificados se cortaron con los enzimas adecuados para cada caso (Tabla 3.6), usando el tampón adecuado para cada caso y respetando la temperatura y el tiempo de incubación recomendados por el fabricante. Los fragmentos deseados fueron purificados por electroforesis en gel de agarosa y extracción de banda mediante el Kit extracción de ADN a partir de geles de agarosa (Millipore).

3.2.4. Ligación

Las ligaciones entre los vectores y los correspondientes insertos, se llevaron a cabo utilizando la ADN ligasa del bacteriófago T4 (Stillman et al., 1982)(New England Biolabs, Hertfordshire, Reino Unido) a una concentración final de 20 U/ μ l, y una relación molar vector:inserto de 1:10. Las reacciones se incubaron durante la noche a 16 °C en el tampón proporcionado por la misma casa comercial.

3.2.5. Electroforesis de ADN

La electroforesis de ADN es una técnica analítica usada para separar diferentes fragmentos de ADN en función de su tamaño a través de los poros de un gel de agarosa. Debido a la carga neta negativa de los grupos fosfato a un pH superior a 5, la aplicación de un campo eléctrico permite que las moléculas de ADN migren hacia el polo positivo. Dada la relación carga/masa igual para todos los fragmentos lineales de ADN, la velocidad de migración de estas moléculas pasa a depender únicamente de su tamaño. De este modo, los fragmentos más pequeños realizan más recorrido en un mismo tiempo y quedan más cerca del ánodo. Una vez finalizada la electroforesis, el gradiente de fragmentación es analizado.

Para la preparación de los geles, se utilizaron disoluciones de agarosa (al 0,8 o 1 %) en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM (pH 8.0), ácido acético al 1,1 % (v/v), EDTA 1 mM), a las que se añadió *SYBR-Safe* (Invitrogen) a una concentración final de 1:10000 (v/v), para la visualización de los fragmentos de ADN. Las muestras de ADN se prepararon en tampón de carga (azul de bromofenol 0,25 % (p/v) y glicerol 30 % (v/v)) y se cargaron en el gel. La posterior electroforesis se realizó a 100 voltios en tampón TAE y los fragmentos de ADN se analizaron en un transiluminador ultravioleta (Vilber, Lourmat, Francia).

3.2.6. Cuantificación de ADN

Para la cuantificación de ADN, se utilizó el *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific), un espectrofotómetro de espectro total (220-750nm) que mide concentraciones de proteína y ácidos nucleicos con gran exactitud y reproducibilidad, utilizando para ello volúmenes de muestra muy pequeños (entre 1 y 4 μ l). Además, a diferencia del espectrofotómetro estándar en el que el paso óptico es de 10 mm, el *NanoDrop* utiliza pasos ópticos de 0,2 y 1 mm, pudiéndose de este modo medir muestras hasta 50 veces más concentradas que en cubetas estándar. Para medir la concentración de los ácidos nucleicos, se siguen las siguientes equivalencias:

1 unidad de absorbancia (260nm) = 50 µg/ml ADN de doble hebra, o 33 µg/ml ADN de hebra simple.

3.2.7. Transformación por electroporación

La electroporación implica la aplicación de corriente eléctrica a células, para crear poros transitorios en sus membranas celulares y permitir así mediante efecto electroforético, la entrada de las moléculas de ADN cargadas negativamente a su interior. La preparación de células *E. coli* electrocompetentes se realiza eliminando todas las sales del medio mediante sucesivos lavados, asegurándose de este modo de que la corriente eléctrica no se transmita a través del medio. La electroporación se lleva a cabo a 4 °C para minimizar el daño por calor. La eficiencia del método es del orden 10⁹-10¹⁰ colonias transformadas por µg de ADN.

Las células electrocompetentes se prepararon creciendo un cultivo de 10 ml en medio LB hasta saturación, que se empleó después como inóculo para un cultivo de 500 ml. Tras alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5, se enfrió dicho cultivo en hielo durante 20 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a 8000 rpm en un rotor Beckman JLA-9.1000 a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 500 ml de una disolución de glicerol 10 % (v/v) y se repitió el ciclo de centrifugación. El nuevo sedimento se resuspendió en 20 ml de la misma disolución de glicerol y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, las células se resuspendieron en 3 ml de disolución de glicerol al 10 % (v/v) y se almacenaron a -80 °C en alícuotas de 50 µl.

Para la electroporación de las células electrocompetentes, 50 µl de las células se mezclaron con 1-4 µl del plásmido correspondiente en cubetas de electroporación de 2mm de paso (BioRad, Hercules, California, EEUU) previamente enfriadas a 4 °C. Los parámetros del electroporador *Xcell* (BioRad, Hercules, California, EEUU) se ajustaron a 2.5 kV, 25 uV y 200 Ω y la cubeta fue sometida a un pulso de 4-5 ms. Después, las células se diluyeron en 1 ml de cultivo LB enfriado previamente a 4 °C, y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Finalmente, se sembraron 50 µl de estas células cuando se electroporaron plásmidos superenrollados o el cultivo completo obtenido por centrifugación a 8.000 rpm durante 10 min a 4°C en el caso de ligaciones, en placas de LB-agar preparadas con los antibióticos correspondientes y se incubaron toda la noche a 37 °C.

3.2.8. Transformación por cloruro de calcio

Para la transformación con CaCl₂ se utilizó una modificación del método descrito por Cohen y colaboradores (Cohen et al. 1972) Se cultivaron células de *E. coli* durante toda

la noche hasta alcanzar la saturación en medio LB. Se realizó una dilución (1/20) de la suspensión celular y se cultivó hasta una densidad óptica de 0,3 a 700 nm. Las células se pusieron en hielo y se centrifugaron 4 ml del cultivo durante 10 minutos a 8.000 rpm a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 1 ml de una disolución estéril y fría de CaCl₂ 100 mM, y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 1 minuto a 8.000 rpm a 4 °C, se eliminaron 900 µl del sobrenadante y se resuspendieron las células en los 100 µl de CaCl₂ restantes.

Para la transformación se añadieron 50 µl de las células obtenidas sobre 2 µl de ADN plasmídico obtenido de ligación o de una extracción de cultivo bacteriano. Se homogenizó la mezcla y se mantuvo en hielo durante 15 minutos. A continuación, se efectuó un choque térmico a 42 °C durante 1 minuto y 30 segundos. Inmediatamente, se añadieron 500 µl de medio LB y se incubó durante 45 minutos a 30°C. Finalmente, las células se centrifugaron durante 1 minuto a 8.000 rpm a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 µl de LB para sembrarlas en placas de LB-agar con el antibiótico adecuado. Se incubaron durante toda la noche en una estufa a 37°C.

3.3. CLONAJE Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

En esta Tesis se han empleado por primera vez en nuestro laboratorio las siguientes chaperonas humanas: Apg2 (HspA4) de la familia Hsp110, Hsc70 (HspA8) de la familia Hsp70, DnaJB1, de la familia Hsp40. También se han generado diversos mutantes de delección y puntuales de alguna de ellas tal y como se detalla en la Tabla 3.5. Para ello, se han diseñado y optimizado diferentes protocolos de purificación de dichas proteínas. Asimismo, se han utilizado también otras proteínas y péptidos a modo de sustrato durante los diferentes experimentos de este trabajo.

3.3.1. Clonaje de las proteínas y de sus mutantes

Las chaperonas humanas generadas durante la realización de esta Tesis y sus mutantes (Tabla 3.5) fueron clonadas en el plásmido pE-Sumo Pro (LifeSensors Inc. Malvern). En este plásmido, la proteína de interés se clona fusionada en su N-terminal a una etiqueta de 6 histidinas y la proteína SUMO de levaduras (Smt3). SUMO mejora la sobreexpresión y solubilidad de proteínas eucariotas recombinantes en sistemas bacterianos, y puede ser posteriormente eliminada con facilidad de la proteína de interés, mediante su proteólisis con la proteasa Ulp1. Además, la cola de histidinas que posee en su amino terminal permite la purificación de la proteína fusionada mediante cromatografía de afinidad en columnas quelantes de Ni²⁺.

TABLA 3.4. Las chaperonas y los mutantes clonadas en esta Tesis.

PROTEINA	OBTENCIÓN	DESCRIPCIÓN
Apg2	Purificación recombinante	Hsp110 humana
Apg2ΔAS	Purificación recombinante	Mutante de eliminación del dominio AS (residuos 502-569)
Apg2ΔC	Purificación recombinante	Mutante de eliminación de la extensión en el C-terminal (residuos 702-840).
Apg2-D7S	Purificación recombinante	Mutante puntual deficiente en actividad ATPasa.
Hsc70	Purificación recombinante	Hsp70 humana constitutiva
Hsc70-T204A	Purificación recombinante	Mutante puntual deficiente en actividad ATPasa.
Hsc70-V438F	Purificación recombinante	Mutante puntual que presenta una unión deficiente a sustratos proteicos
Hsc70_{Strep}	Purificación recombinante	Fusión de una cola de streptavidina al extremo C-terminal
70-NBD	Purificación recombinante	Dominio NBD de Hsc70 (residuos 1 a 384)
70-NBD_{Strep}	Purificación recombinante	Dominio NBD de Hsc70 fusionado a una cola de streptavidina C-terminal
DNAJB1	Purificación recombinante	Hsp40 humana

Las proteínas se clonaron completas desde el residuo deseado (generalmente la M1) en el plásmido pE-SUMO mediante oligonucleótidos y técnicas de Biología Molecular como se detalla en la Tabla 3.6. En el caso de Apg2 y de sus mutantes fue necesaria la inserción de la secuencia GAGA en su extremo N-terminal ya que, debido posiblemente a problemas de accesibilidad, la proteasa Ulp1 era incapaz de acceder a la secuencia diana.

También se emplearon otras proteínas y un péptido de origen comercial (Tabla 3.7), así como la proteasa Ulp1 que se produjo en el laboratorio por expresión recombinante a partir de un plásmido cedido generosamente por el Dr. Guillermo Montoya.

TABLA 3.5. Clonaje de las proteínas utilizadas en esta Tesis. Se detallan los oligos y los enzimas de restricción utilizados para el clonaje de cada una de las proteínas.

PROTEÍNA	OLIGONUCLEÓTIDOS	CLONAJE
Apg2	HG2FESP2F ATCGTCTCAAGGTGGAGCGGGTGCCTCGGTGGTGGGC HG2R GCTCTAGATCAATCAATGTCCATTTAGGAAG	Inserto: <i>BsmBI</i> + <i>XbaI</i> pE-SUMO pro: <i>BsaI</i>
Apg2ΔAS	HG2FESP2F ATCGTCTCAAGGTGGAGCGGGTGCCTCGGTGGTGGGC HG2DLRa ATGGTCTCAGCAGACTTGTGAACCTCCAC HG2DLFb ATGGTCTCACTGCAAAAGTGAAGACCAGTAC HG2R GCTCTAGATCAATCAATGTCCATTTAGGAAG	Inserto: Fragmento a: <i>BsaI</i> Fragmento b: <i>BsmBI/XbaI</i> pE-SUMO pro: <i>BsaI</i>
Apg2ΔC	HG2FESP2F ATCGTCTCAAGGTGGAGCGGGTGCCTCGGTGGTGGGC HG2DCR GCTCTAGATCATTCTTCAAATAATTTTGGTCG	Inserto: <i>BsmBI/XbaI</i> pE-SUMO pro: <i>BsaI</i>
Apg2-D7S	HG2D7SF CTCTGGAAGCCCAGGCTTATGCCACCACC HG2D7SR GGTGGTGGGCATAAGCCTGGGCTCCAGAG	Quickchange
Hsc70	HC70F ATCGTCTCAAGGTATGTCCAAGGGACCTGC HC70R GCTCTAGATTAATCAACCTTTCAATGG	Inserto: <i>BsmBI/XbaI</i> pE-SUMO pro: <i>BsaI</i>
Hsc70-T204A	C70T204AF GACCTGGGAGGTGGCGCTTTTGTGTCAATC C70T204AR GATTGACACATCAAAGCGCCACCTCCAGGTC	Quickchange
Hsc70-V438F	Gen obtenido por síntesis	
Hsc70_{Strep}	HC70F HC70STREPR GCTCTAGATCATTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGC GCTATCAACCTTTCAATGG	Inserto: <i>BsmBI/XbaI</i> pE-SUMO pro: <i>BsaI</i>
70-NBD	HC70F HC70NBDR GCTCTAGATTACTTGTCTCCAGACAAGATG	Inserto: <i>BsmBI/XbaI</i> pE-SUMO pro: <i>BsaI</i>
70-NBD_{Strep}	HC70F HC70NBDSR GCTCTAGATCATTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAG CGCTCTGTCTCCAGACAAGATG	Inserto: <i>BsmBI/XbaI</i> pE-SUMO pro: <i>BsaI</i>
DNAJB1	HJ1F ATCGTCTCAAGGTATGGTAAAGACTACTACC HJ1R GCTCTAGACTATATTGGAAGAACCTGC	Inserto: <i>BsmBI/XbaI</i> pE-SUMO pro: <i>BsaI</i>

TABLA 3.6: Otras proteínas empleadas en esta Tesis.

PROTEINA	OBTENCIÓN	DESCRIPCIÓN
Ulp1	Purificación recombinante	Proteasa específica para la eliminación de la etiqueta SUMO
Luciferasa	Roche	Substrato para ensayos de replegamiento
Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa	Sigma-Aldrich	Sustrato empleado en los ensayos de reactivación proteica
Lactato Deshidrogenasa	Roche	Componente del sistema de regeneración de ATP
Piruvato Kinasa	Roche	Componente del sistema de regeneración de ATP
Péptido FT7: FYQLALT	Proteogenix	Sustrato empleado en los ensayos de unión

3.3.2. Purificación de las chaperonas.

Se siguió un protocolo de purificación general y común a todas las chaperonas clonadas en el plásmido pE-SUMO pro. Para ello se crecieron preinóculos de células de *E. coli* transformadas con el plásmido correspondiente hasta saturación en cultivos de 25 ml de medio LB, durante toda la noche a 37 °C, en presencia de los antibióticos ampicilina y cloranfenicol (100 µg/ml y 35µg/ml, respectivamente). Después, los preinóculos se diluyeron 1:50 en matraces de 600 ml de LB y se incubaron a la temperatura deseada hasta alcanzar la fase exponencial (OD₆₀₀ de 0,6). En este momento, se indujo la sobreexpresión de la proteína mediante la adición de NaCl 0,3 M y de IPTG 0,1 mM, en agitación continua, a diferentes temperaturas y tiempos para cada una de las chaperonas.

Las células se recogieron por centrifugación (10 minutos, 8.000 x g, rotor Beckman JLA 9.1000) y se resuspendió el sedimento en tampón de lisis: Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 350 mM, Imidazol 10 mM, TCEP 1 mM, sacarosa 20%, glicerol 5% (v/v), Triton x-100 0,2%, PMSF 1 mM y 1 pastilla del inhibidor de proteasas cOMplete EDTA-free (Roche) por cada 50 ml. A continuación, se rompieron las células por ultrasonidos (3 ciclos de 20 s por cada 50 ml de muestra, con intervalos de 30 s para enfriar la muestra) en baño de hielo en un *MSE Soniprep 150* (MSE, Leicestershire, Reino Unido). Se ultracentrifugó el lisado celular durante 30 minutos a 35.000 rpm y 4 °C en un rotor Beckman 70.38 y

el sobrenadante se cargó en la columna HisTrap™ Fast Flow, GE Healthcare de 5 ml equilibrada en tampón A1 (Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 350 mM, Imidazol 10 mM (pH 8), TCEP 1 mM y glicerol 5 % (v/v)). Tras el lavado de la muestra con un volumen de columna de tampón A2 (Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 1 M, Imidazol 10 mM (pH 8), TCEP 1 mM y glicerol 5% (v/v)) y reequilibrado en tampón A1, se eluyó la proteína con 50 ml de tampón B (Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 350 mM, Imidazol 400 mM, TCEP 1 mM, glicerol 5% (v/v)). Las fracciones que contenían la proteína deseada fueron identificadas por electroforesis desnaturalizante. Se añadió Ulp1 (1,2 mg) a las fracciones seleccionadas para eliminar la etiqueta His₆-SUMO, y se dejaron dializando a 4°C contra el tampón A1 a 4°C, durante toda la noche. Al día siguiente, la preparación proteica se volvió a pasar por la columna HisTrap™ Fast Flow recogiendo la fracción no pegada a la columna, tras la proteólisis de la etiqueta His₆-SUMO. Por último, la proteína se dializó contra el tampón C (Hepes-KOH 25 mM, pH 7,6, KCl 100 mM, DTT 2 mM y glicerol 10% (v/v)), se concentró (Amicon Ultra-15, membrana PLQK Ultracel-PL) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se alicuotó, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -20°C.

3.3.2.1. Características particulares de la purificación de Apg2, Hsc70 y DnaJB1

A continuación, se detallan las células, tiempos y temperaturas empleadas para la expresión de las diferentes chaperonas, así como detalles adicionales de su purificación:

- Apg2 y los mutantes Apg2ΔAS, Apg2ΔC y Apg2-D7S se expresaron en *BL21 (DE3) Rosetta pLysS* a 20 °C durante 22 horas.
- Hsc70 y los mutantes Hsc70-T204A, Hsc70-V438F, Hsc70_{Strep}, 70-NBD y 70-NBD_{Strep} se produjeron en células *BL21 (DE3) CodonPlus-RIPL* durante 14 horas a 20 °C. Además, la purificación de estas proteínas fue optimizada mediante una cromatografía adicional con hidroxapatito. Para ello, la muestra obtenida del último paso a través de la columna quelante de Ni²⁺ se dializó a 4 °C contra el tampón C (Na₂HPO₄ 10 mM, pH 6,8, β-Me 5 mM y glicerol 10 % (v/v)). Al día siguiente, se cargó en una columna de hidroxapatito (Macro-prep Ceramic Hydroxyapatite TYPE I, Bio Rad) previamente equilibrada con el mismo tampón C, y se eluyó con un gradiente de 100 ml de 10 a 500 mM de NaH₂PO₄, pH 6,8, KCl 350 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 2 mM, glicerol 10 % (v/v). Finalmente, la proteína se concentró (Amicon Ultra-15, membrana PLQK Ultracel-PL, 50KDa) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se alicuotó, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -20 °C.

- DNAJB1 se expresó en células *BL21 (DE3) CodonPlus-RIPL* durante 4 horas a 37 °C.

3.3.2.2. Purificación de ULP1

Se crecieron células *BL21 (DE3) CodonPlus-RIPL* transformadas con el plásmido pGM-ULP1 hasta saturación en cultivos LB de 25 ml, durante toda la noche a 30 °C, en presencia de antibióticos ampicilina y cloranfenicol (100 µg/ml y 35 µg/ml, respectivamente). Después, los cultivos se diluyeron en matraces de 500 ml de LB y se incubaron a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial (OD₆₀₀ de 0.6). En este momento, se indujo la sobreexpresión de la proteína mediante la adición de IPTG 1 mM, en agitación continua, durante 4 horas a 30°C.

Se concentraron las células por centrifugación (10 minutos, 8.000 x g) y se resuspendió el sedimento en tampón de lisis (Tris-HCl 50mM (pH 8), NaCl 350mM, Imidazol 10mM, TCEP 1mM, sacarosa 20 %, Triton x-100 0,2 % y PMSF 1 mM). A continuación, se rompieron las células por ultrasonidos (3 ciclos de 20 s por cada 50 ml de muestra, con intervalos de 30 s para enfriar la muestra en baño de hielo en un *MSE Soniprep 150* (MSE, Leicestershire, Reino Unido). Se ultracentrifugó el lisado celular (30 minutos, 35000 r.p.m., 4 °C, rotor Beckman 70.38) y el sobrenadante se cargó en una columna de afinidad de níquel (HisTrap™ Fast Flow, GE Healthcare) de 5 ml previamente equilibrada en tampón A_{ULP} (Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 350 mM, Imidazol 10 mM (pH 8) y TCEP 1 mM). La proteína se eluyó con un gradiente de 100 ml de 10 a 400 mM de imidazol (pH8), Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 350 mM y TCEP 1 mM, y se dejó dializando a 4 °C contra el tampón B_{ULP} (Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 350 mM y β-Me 1 mM) durante toda la noche. Finalmente, la proteína se concentró (Amicon Ultra-15, membrana PLQK Ultracel-PL, 30KDa) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se alicuotó, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

3.3.2.3. Otras proteínas y péptidos

3.3.2.3.1. Luciferasa

La luciferasa de *Photinus pyralis* (Roche, Indianapolis, EEUU) es una enzima monomérica de 61 kDa capaz de generar luminiscencia en una reacción de oxidación que requiere magnesio y oxígeno como catalizadores, y ATP y luciferina como sustratos. En esta reacción, la energía química liberada tras la oxidación de la luciferina a oxiluciferina, es transformada en energía fotolumínica (Figura 3.3).

Para la preparación de la luciferasa, se resuspendió todo el contenido del stock comercial a una concentración final de 65 μM de luciferasa en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) y se almacenó en alícuotas de 10 μl en viales de vidrio. Todo el proceso se llevó a cabo en hielo y con puntas especiales de *low retention* (BrandTech Scientific, Inc.). Los viales se almacenaron a -20°C .

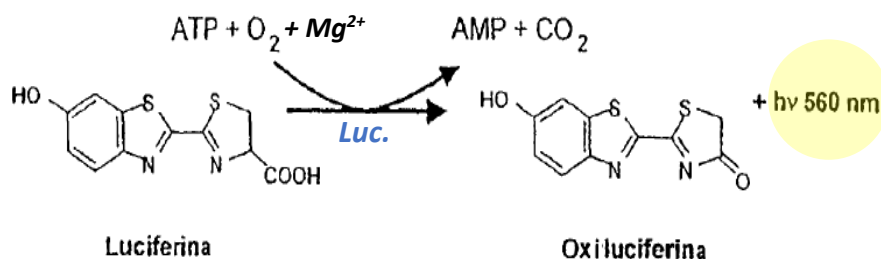


Figura 3.3: Reacción catalizada por la Luciferasa. En presencia de ATP, magnesio y oxígeno, la luciferasa cataliza la reacción de oxidación de luciferina a oxiluciferina. Como resultado, se libera energía en forma de luminiscencia.

La luciferina se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante del *kit* comercial (Roche, Indianapolis, EEUU). Se disolvió la pastilla de luciferina en los 10 ml de tampón (ambos proporcionados por el fabricante), se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó cubierta en papel de plata, a -20°C .

3.3.2.3.2. Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa (G6PDH)

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Sigma-Aldrich, USA) es una enzima dimérica (54.4 kDa cada monómero) presente en todos los seres vivos que lleva a cabo la catálisis de la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato. En esta reacción de deshidrogenación, la glucosa-6-fosfato es transformada en 6-fosfofluconato, gracias a la reducción de una molécula de NADP⁺ a NADPH (Figura 3.4). El proceso es fácilmente medible siguiendo la generación de NADPH registrando la absorbancia de la muestra a 340 nm.

Para la preparación de la G6PDH, se resuspendió todo el contenido del stock comercial en 300 μl de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se almacenó a -20°C en alícuotas de 15 μl . La concentración se determinó por el método Bradford (apartado 3.4.4.1.).

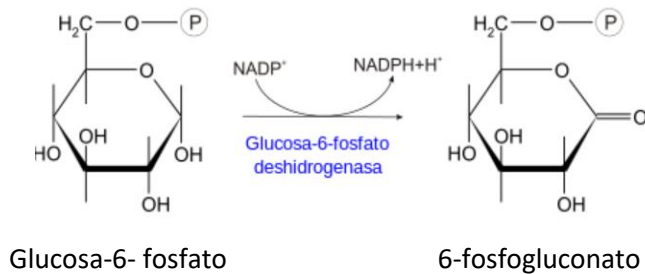


Figura 3.4: Reacción catalizada por la Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa. La G6PDH oxida la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato mediante la reducción de una molécula de NADP^+ a NADPH .

3.3.2.3.3. Lactato Deshidrogenasa (LDH)

La Lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche) es una enzima tetramérica (35 kDa cada monómero) que lleva a cabo la reducción reversible de piruvato a lactato mediante la oxidación de NADH a NAD^+ (Figura 3.5). La actividad enzimática de esta enzima puede seguirse registrando la absorbancia de la muestra a 340 nm para medir el consumo de NADH a 340nm. En esta Tesis, la LDH se utiliza como parte del sistema regenerador de ATP en diferentes experimentos.



FIGURA 3.5. Reacción catalizada por la Lactato Deshidrogenasa. La LDH cataliza la reacción reversible de reducción del piruvato a lactato, oxidando para ello una molécula de NADH a NAD^+ .

Para la preparación de esta proteína, diluimos a la mitad una alícuota tomada del stock comercial en el mismo tampón frente al cual después la dejamos dializando a 4 °C durante toda la noche (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl_2 20 mM y KCl 150 mM). Al día siguiente, añadimos glicerol hasta una concentración final del 20 % (v/v), alícuotamos la proteína y la congelamos en nitrógeno para finalmente almacenarla a -20 °C.

3.3.2.3.4. Piruvato Kinasa (PK)

La Piruvato Kinasa (PK) (Roche) es una enzima tetramérica (57 KDa cada monómero) responsable de llevar a cabo el último paso de la glicólisis. Cataliza la transferencia de un grupo fosfato desde el fosfoenol piruvato (PEP) al ADP, generándose así una molécula de piruvato y otra de ATP. Al igual que la LDH, la PK se utiliza como parte del sistema regenerador de ATP en diferentes experimentos.

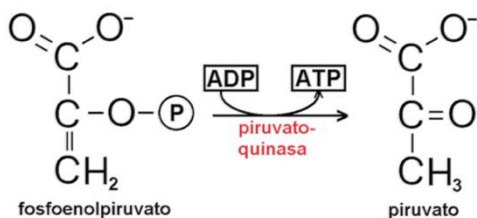


Figura 3.6. Reacción catalizada por la Piruvato Kinasa. La PK cataliza la reacción de transferencia de un grupo fosfato desde el fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP. Como resultado, se obtienen una molécula de ATP y una de piruvato. Gracias a esta reacción se consigue regenerar el ATP para mantener su concentración constante a lo largo del experimento.

La proteína se emplea directamente del stock comercial suministrado sin preparación adicional.

3.3.2.3.5. Péptido FYQLALT.

El péptido FYQLALT (FT7) fue sintetizado por Proteogenix, Schiltigheim Francia. Es un péptido de 855 Da utilizado en este trabajo para los estudios de unión y liberación por parte de Hsc70 (o de sus complejos con Apg2), ya que interacciona específicamente con Hsc70 y no es unido por Apg2. Para la realización de dichos experimentos, el péptido se adquirió marcado con la sonda fluorescente 5-TAMRA (5-carboxitetrametilrodamina).

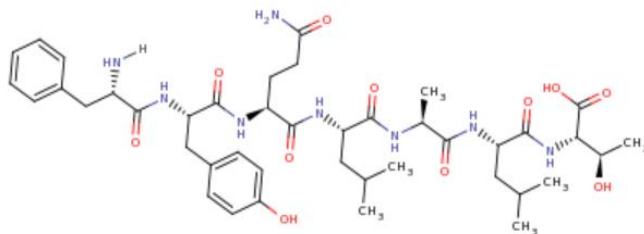


Figura 3.7: Estructura molecular del péptido FYQLALT (FT7). Este péptido se une específicamente a la chaperona humana Hsc70. En este trabajo se utilizó

para realizar los experimentos de unión y liberación de péptidos por parte de las chaperonas.

3.4. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS DE PROTEÍNAS

3.4.1. Electroforesis desnaturizante en SDS-PAGE

El análisis de proteínas mediante geles desnaturizante de SDS-PAGE (**P**oly**A**crilamide **G**el **E**lectrophoresis) fue llevado a cabo siguiendo el método descrito por (Laemmli 1970). Esta técnica permite la separación de proteínas en función de su masa molecular ya que su unión al SDS provoca que estas macromoléculas adquieran una relación carga/masa similar. Por este motivo, cuando sometemos a estas muestras a un campo eléctrico a través de un tamiz de poliacrilamida, se separan fundamentalmente obedeciendo a su tamaño. Los porcentajes de poliacrilamida utilizados normalmente para llevar a cabo esta técnica son del 10 % al 12,5 %.

Los geles se diseñaron conteniendo dos zonas: una zona concentradora y otra separadora. La región concentradora se preparó utilizando un 4.7 % de acrilamida/bisacrilamida (30/0,8) (Bio-Rad), Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 10 % (p/v), PSA 0,1 % (p/v) y TEMED 0,15 % (v/v). Para preparar la región separadora, el porcentaje de acrilamida/bisacrilamida (30:0,8) (Bio-Rad) utilizado fue del 12,5 % en tampón Tris 375 mM (pH 6,8), SDS 10 % (p/v), PSA 0,1 % (p/v) y TEMED 0,15 % (v/v). Las muestras se prepararon añadiéndoles tampón de carga (Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), glicerol 5 % (v/v), SDS 4 % (p/v), azul de bromofenol 0,02 % (p/v) y DTT 100 mM) en proporción 1:1. La electroforesis se realizó en tampón glicina 200 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), SDS 1% (p/v) y en sistemas de electroforesis *mini-PROTEAN 2* (Bio-Rad, Madrid, España) a un voltaje constante adaptado a los requerimientos de cada experimento.

Después de la electroforesis, los geles se tiñeron siguiendo el método descrito por (Lawrence y Besir, 2009). Este método se basa en la interacción electrostática entre el azul de *Coomasie* y los aminoácidos de la proteína. Este complejo estabiliza la forma aniónica del colorante proporcionándole un color azul que puede detectarse en el gel. El número de moléculas unidas al colorante es aproximadamente proporcional a la cantidad de proteína presente en cada banda observada en el gel, lo que permite la cuantificación de las muestras en el gel mediante densitometría. Puesto que la interacción colorante-proteína es reversible, esta puede deshacerse mediante sucesivos lavados con metanol y ácido acético. Siguiendo este método, los geles fueron incubados en una solución que contenía *Coomasie Brilliant Blue R-250* 0,1 % (w/v), metanol 40 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v). Después, se destiñeron utilizando la

misma disolución, pero en ausencia de azul de *Coomasie*. La comparación de las bandas experimentales con una mezcla patrón de pesos moleculares también cargada en el gel, nos permitieron identificar las proteínas de nuestras muestras.

3.4.2. Electroforesis en geles nativos

La electroforesis nativa permite que las proteínas migren a través del campo eléctrico en condiciones no desnaturalizantes. De esta manera, el movimiento de las macromoléculas a través del gel depende tanto de la carga intrínseca como del tamaño y forma de las proteínas. Debido a que durante esta electroforesis las proteínas conservan su conformación nativa, esta técnica nos permite analizar su estado oligomérico, así como la formación de diferentes complejos entre estas o diferentes proteínas.

En esta Tesis, se llevó a cabo la electroforesis nativa para la determinación y cuantificación de los complejos formados entre las chaperonas Apg2 y Hsc70 y sus correspondientes mutantes. Las muestras se prepararon en buffer de ensayo (Hepes-KOH 40 mM, pH 7,6, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM y DTT 2 mM) y se incubaron en presencia/ausencia de nucleótido, a temperatura ambiente durante toda la noche. Antes de cargar las muestras en el gel, se les añadió tampón de carga (Bis-Tris 50 mM (pH 7,2), HCl 6 N, NaCl 50 mM, glicerol 10% (p/v) y *Ponceau S* 0,001 % (v/v)) (Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos). Se utilizaron geles nativos en gradiente de poliacrilamida *NativePage* 4-16 % Bis-Tris (Invitrogen) y la electroforesis se llevó a cabo en cubetas *XCell SureLock* (Invitrogen), en tampón *NativePage* Running Buffer (20x) diluido (Bis-Tris 50 mM, Tricina 50 mM (pH 6,8)) (Invitrogen) a 4 °C y a un voltaje constante de 150 V y de 250 V, durante 45 minutos y 1 hora y media, respectivamente. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de *Coomassie* como se describe anteriormente para su posterior análisis y cuantificación.

3.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Existen diferentes métodos para determinar la concentración de proteína. En esta Tesis se han utilizado dos métodos diferentes, el método Bradford (Bradford, 1976) y el método por absorbancia.

3.5.1. Método Bradford.

El método Bradford se basa en la propiedad que tiene el azul de *Coomasie G* o el *Serva Blue G* para interaccionar con residuos básicos o aromáticos de las proteínas (especialmente con argininas y, en menor medida, con residuos de histidina, lisina,

tirosina, triptófano y fenilalanina)(Compton y Jones 1985). Estas interacciones de carácter iónico e hidrofóbico, estabilizan la sonda en su forma aniónica y como consecuencia, el máximo de absorbancia de ésta se desplaza de 465nm a 595nm provocando un cambio de color en la disolución (de marrón a azul). Mediante este método se pueden detectar cantidades de entre 0,2 a 20 µg de proteína. Para estimar la concentración de proteína de las muestras, se preparó en paralelo una curva patrón añadiendo de 0 a 16 µg de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) en 100 µl finales de agua. Las muestras a determinar se prepararon también en el mismo volumen final de agua. El reactivo de Bradford (BioRad, Hércules, CA, EEUU) se diluyó 5 veces y después se añadió 1 ml a cada una de las muestras y a la curva patrón. Tras agitar todos los tubos, se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se midió la absorbancia de todos ellos a 595 nm en un espectrofotómetro. El cálculo de la concentración proteica de las muestras se realizó mediante la representación de la absorbancia frente a la concentración conocida de BSA. A partir de la ecuación obtenida de esta recta patrón ($y = ax + b$), se estimó la concentración de proteína de nuestras muestras.

3.5.2. Absorbancia

Otro método alternativo para determinar la concentración de proteína es la medida de absorbancia a 280nm, longitud de onda a la que absorben los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) de las proteínas. La absorbancia y la concentración de proteína se encuentran directamente relacionadas a través de la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Donde **A** es la absorbancia medida a 280nm, ϵ es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), **c** es la concentración de proteína y **l** el paso óptico de luz (cm). Las medidas fueron llevadas a cabo en un espectrofotómetro *Cary 3 Bio* (Varian, Victoria, Australia).

3.5.3. Densitometría

Esta técnica permite cuantificar la cantidad de proteína existente en una determinada banda de un gel de poliacrilamida nativo o desnaturizante (apartados 3.4.1. o 3.4.3, respectivamente). Tras la tinción con azul de *Coomasie* (apartado 3.4.2.) y su posterior desteñido, los geles se escanearon en un densitómetro *GS-800 Calibrated* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos) y se midió la densidad de cada una de las bandas utilizando el programa *Quantity One v 4.5.0* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos). Para calcular los µg de proteína contenidos en

cada una de las bandas problema, la densidad de cada una de ellas se normalizó con respecto a la de una banda de proteína patrón de concentración conocida.

3.6. MÉTODOS BIOQUÍMICOS UTILIZADOS PARA DETERMINAR LA CONFORMACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS CHAPERONAS

3.6.1. Proteólisis parcial con tripsina.

Para el estudio de la conformación global de Apg2 y de sus diferentes mutantes, las proteínas se sometieron a proteólisis controlada por tripsina. Esta proteasa digiere las proteínas cortando la cadena polipeptídica tras los aminoácidos básicos lisina y arginina (siempre que no se encuentren adyacentes a una prolina). En función de la estructura terciaria que adopte la cadena polipeptídica a cortar, la tripsina tendrá diferente accesibilidad a los puntos de corte. De este modo, el análisis de patrones de tripsinólisis de una misma proteína en diferentes condiciones o en presencia de ligandos, refleja los cambios conformacionales de la proteína o su interacción con otras. Mediante esta técnica quisimos caracterizar los posibles cambios conformacionales y/o de estabilidad de Apg2 y de sus mutantes, en presencia de diferentes nucleótidos.

Los experimentos de tripsinólisis se llevaron a cabo en tampón Hepes-KOH 40 mM (pH 7,6), KCl 200 mM, MgCl₂ 10 mM y DTT 2 mM. Apg2 (0,33 µg/µl) se incubó a 30 °C en presencia o ausencia de ADP o ATP (1 mM), y la reacción de tripsinólisis se inició tras la adición de 1 µg/ml de tripsina. Se tomaron alícuotas de las muestras a diferentes tiempos (0, 1, 5, 10 y 20 minutos) que se analizaron mediante SDS-PAGE.

3.6.2. Cromatografía de tamizado molecular analítica.

La cromatografía es una técnica muy común que se utiliza para separar los componentes presentes en una muestra heterogénea. El método se basa en hacer pasar una fase móvil (mezcla de compuestos a separar) a través de una fase estacionaria. Dependiendo de la afinidad relativa que tengan por ambas fases, mayor será la eficiencia de separación de dichos compuestos. En la cromatografía de tamizado molecular (también conocida como filtración en gel o de exclusión molecular), la fase estacionaria está formada por una resina cuyas partículas crean una tamiz o filtro que los componentes de la fase móvil van atravesando con mayor o menor dificultad, atendiendo a su masa molecular y a su volumen hidrodinámico (Figura 3.8). De esta manera, aquellos compuestos con un tamaño superior al diámetro de los poros de las partículas de la fase estacionaria, pasarán a través de la columna sin mayor problema, mientras que las moléculas capaces de penetrar en dichas partículas, irán sorteándolas

retrasando así su salida de la columna. Por lo tanto, cuanto menor sea su masa molecular aparente, mayor será el volumen al que eluirá un determinado compuesto.

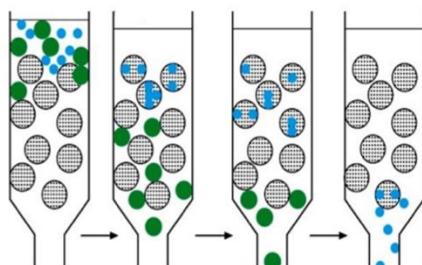


Figura 3.8. Cromatografía de tamizado molecular. Durante su paso por la columna, las moléculas de menor tamaño (azules) irán penetrando las partículas que forman la resina de la columna, retrasando así su salida al exterior. Por el contrario, las moléculas de mayor tamaño (verdes) atravesarán la resina con mayor velocidad, abandonando antes la columna.

En esta Tesis se ha utilizado esta técnica para la caracterización de los estados oligoméricos de las chaperonas moleculares y de los complejos formados entre ellas. Con la finalidad de estudiar los perfiles de elución y diferentes estados oligoméricos de las chaperonas (en solitario y formando complejos entre ellas), se prepararon las muestras bajo cada una de las condiciones a caracterizar y se hicieron pasar por la columna de tamizado molecular Bio SEC-5 300 Å (Agilent). Todas las cromatografías se llevaron a cabo a temperatura ambiente en tampón Hepes-KOH 40 mM (pH 7,6), KCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM y DTT 2 mM.

3.6.3. Actividad ATPasa

La actividad ATPasa de las chaperonas y de sus mutantes se midió mediante el método espectrofotométrico descrito por (Nørby 1988), en el que el ATP hidrolizado por las chaperonas es regenerado mediante un sistema de proteínas acopladas, para mantener la concentración de nucleótido constante durante todo el ensayo, lo que permite la determinación de velocidades iniciales de reacción. En la reacción acoplada (Figura 3.9), el ADP generado tras la hidrólisis por parte de las chaperonas es convertido nuevamente en ATP por la PK, utilizando para ello el fosfoenol piruvato (PEP), y obteniendo piruvato como producto. A su vez, LDH convierte este piruvato en lactato, oxidando para ello una molécula de NADH a NAD⁺. Teniendo en cuenta todo el proceso, el consumo de ATP por parte de las chaperonas es equimolar a la oxidación de NADH por parte de la LDH. Por lo tanto, se puede caracterizar el consumo de ATP por parte de las chaperonas monitorizando de forma continua el descenso en la concentración

de NADH mediante el registro la absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm (longitud de onda del máximo de absorción del NADH) en un espectrofotómetro,

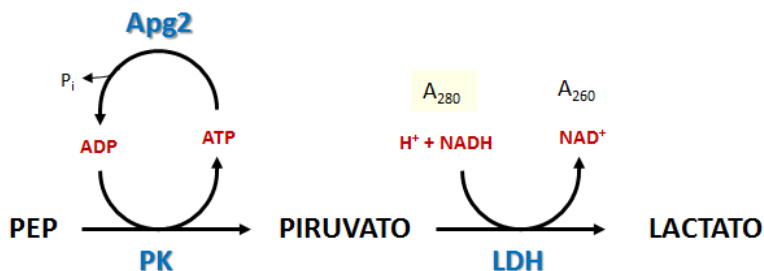


Figura 3.9: Esquema del sistema acoplado regenerador de ATP. Sistema de regeneración de cada molécula de ATP consumido por las chaperonas (Apg2 en el esquema) mediante las reacciones mediadas por los enzimas PK y LDH que acoplan la transferencia del grupo fosfato del PEP al ADP a la oxidación de NADH. Esto permite seguir la hidrólisis de ATP registrando el descenso de absorbancia a 340 nm.

La actividad ATPasa de las chaperonas aisladas, sus mutantes y diferentes mezclas de ellas se midió a 30 °C en tampón Hepes-KOH 40 mM (pH 7,6), KCl 50 mM, Mg(OAc)₂ 5 mM, NADH 0,3 mM, 0,017 mg/ml LDH, 12,5 ng/ml PK, DTT 2 mM, ATP 1 mM y PEP 2 mM. La reacción se inició añadiendo el ATP al medio y fue seguida midiendo la absorbancia a 340nm en el tiempo. La actividad ATPasa de las chaperonas fue calculada en mol ATP min⁻¹ a partir de las pendientes de absorbancia, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADH a 340nm ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Todas las medidas se realizaron en el lector de placas Synergy HTX (Biotec), utilizando para ello placas transparentes de 96 pocillos (Sarstedt). Antes de iniciar la reacción, se rellenó cada uno de los pocillos con mezclas de las chaperonas correspondientes en cada caso, en un volumen final de 160 μl . Tras 5 minutos de incubación a 30 °C dentro del equipo de medida, se inició la reacción inyectando 40 μl del sistema regenerador de ATP a cada uno de los pocillos mediante el sistema de jeringas del que dispone el propio equipo, hasta completar 200 μl de muestra finales. Tras 10 segundos de agitación, se monitorizó de manera simultánea la reacción de cada uno de los pocillos mediante medidas de absorbancia a 340 nm durante 30 min.

3.6.4. Protección de la agregación de sustratos proteicos.

La capacidad de Hsc70, Apg2 y sus mutantes para proteger sustratos proteicos de la agregación se ensayó empleando LUC que se desnaturalizó en diferentes condiciones. Durante la desnaturalización, las chaperonas unen regiones hidrofóbicas de la proteína

desnaturalizada, evitando de esta manera que estas zonas interactúen entre sí, generando agregados del sustrato. Para estimar la capacidad de protección, LUC se renaturalizó posteriormente tras la adición del resto de los componentes del sistema en presencia de ATP. La reactivación se siguió mediante medidas de su actividad enzimática como se ha descrito anteriormente. Los métodos empleados para desnaturalizar LUC han sido:

3.6.4.1. Desnaturalización química.

Los agentes caotrópicos, promueven el desplegamiento de la estructura nativa de la proteína, induciendo la entrada de moléculas de agua y del agente químico al núcleo hidrofóbico de la proteína, provocando así su desnaturalización. Estos compuestos químicos alteran la estructura y dinámica de las moléculas de agua, disminuyendo el efecto hidrofóbico que estabiliza la estructura nativa y facilitando la exposición superficial de los residuos hidrofóbicos del interior de la estructura de la proteína (Bennion y Daggett 2003). La dilución posterior del agente caotrópico provoca que se puedan establecer interacciones intermoleculares inespecíficas entre los residuos hidrofóbicos de las cadenas proteicas desplegadas y, por lo tanto, su agregación. En los ensayos de esta Tesis, el agente caotrópico utilizado fue la urea y la dilución se realizó en presencia de Hsc70 o Apg2.

3.6.4.2. Desnaturalización térmica.

Por encima de la temperatura de desnaturalización las interacciones débiles que mantienen la estructura nativa de la proteína desaparecen dando lugar a su desnaturalización. La exposición progresiva del núcleo hidrofóbico al disolvente promueve la asociación intermolecular, la cual termina en la formación de grandes agregados proteicos. En estos ensayos se pretende evitar la agregación al realizar la desnaturalización de LUC en presencia de las chaperonas. La temperatura empleada (42°C) no afecta a la estabilidad de Hsc70 y Apg2.

3.6.5. Agregación de sustratos proteicos y reactivación por chaperonas.

Se han empleado agregados proteicos de diferentes tipos y características. Para ello, se han modificado las condiciones de desnaturalización (concentración, tiempo, temperatura, etc.) de las que dependen las propiedades (estabilidad, tamaño y conformación) de los agregados. En este caso, los sustratos modelo utilizados fueron la luciferasa (LUC) y la G6PDH. Estos sustratos se desnaturalizan en ausencia de las chaperonas y tras su adición en presencia de ATP al medio, se estudia cómo la actividad enzimática de la proteína agregada va siendo recuperada en el tiempo. Todas las

medidas de estos experimentos se realizaron en el lector de placas *Synergy HTX* (Biotec).

3.6.5.1. Reactivación de LUC desnaturalizada con Urea

LUC (2 μM) se incubó a 30 °C durante 30 minutos en tampón de desnaturalización (Hepes-KOH 40 mM (pH 7,6), KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, DTT 2 mM y Urea 6 M), tras lo que la muestra fue diluida 100 veces. La adición de las chaperonas y ATP permitió la reactivación de LUC, que se siguió añadiendo alícuotas de la muestra tomadas a diferentes tiempos sobre una disolución de luciferina y medición de la luminiscencia. La reacción se llevó a cabo a 30 °C en el tampón de reactivación (Hepes-KOH 40 mM (pH 7,6), KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, DTT 2 mM, ATP 2 mM, PEP 3 mM y 20 ng/ml PK). La concentración final de luciferasa fue 20 nM.

3.6.5.2. Reactivación de luciferasa agregada térmicamente

LUC (0,1 μM) se incubó a 47°C durante 30 minutos en tampón de ensayo (Hepes-KOH 40 mM (pH 7,6), KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM y DTT 2 mM). Tras la estabilización de la muestra a 30 °C durante 5 minutos, se añadieron las chaperonas, ATP y un sistema regenerador de ATP (PEP 3 mM y 20 ng/ml PK) al medio para comenzar el ensayo de reactivación. La recuperación de la actividad de la luciferasa se siguió del mismo modo que en el apartado 3.5.2.1.1.

3.6.5.3. Reactivación de Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa agregada térmicamente

G6PDH (2,5 μM) se desnaturalizó a 50 °C durante 30 minutos en el tampón de agregación (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), KCl 150 mM, MgCl_2 20 mM y DTT 10 mM). Los agregados formados fueron estabilizados, en el mismo tampón, mediante una segunda incubación de 30 °C durante 30 minutos. La G6PDH agregada fue diluida a una concentración final de 0,4 μM en presencia de chaperonas en tampón de reactivación (Hepes-KOH 40 mM, KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, DTT 2 mM) y la reacción se inició tras la adición de ATP (3 mM) y el sistema regenerador de ATP (PEP 6 mM y 20 ng/ml PK).

3.6.6. Interacción de chaperonas con agregados de G6PDH

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, las chaperonas moleculares son capaces de solubilizar y reactivar diferentes tipos de agregados proteicos. Para que esta reactivación pueda llevarse a cabo, cada una de las cadenas polipeptídicas debe ser extraída de la superficie de dichos agregados y, como es lógico, para que esta extracción pueda llevarse a cabo, las chaperonas deben interaccionar primero con los agregados.

En estos experimentos, los agregados se formaron incubando G6PDH (10 μM) a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min en tampón de agregación (Tris-HCl 40 mM (pH 7,4), KCl 150 mM, MgCl_2 20 mM y DTT 10 mM) y tras su estabilización a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, fueron diluidos a una concentración final de 1 μM en presencia de las chaperonas (Hsc70 2 μM , DnaJB1 0,5 μM y concentraciones crecientes de Apg2 o de sus mutantes) en tampón Hepes-KOH 40 mM (pH 7,6), KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, DTT 2 mM, ATP 2 mM, PEP 8 mM y 20 mg/ μl de PK. Tras 10 minutos de incubación, todas las muestras fueron ultracentrifugadas a 55.000 rpm en un rotor Beckman TLA-55 durante 40 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se retiró el sobrenadante de cada muestra y los sedimentos fueron resuspendidos en tampón de carga y analizados por SDS-PAGE y densitometría. Como control, se prepararon réplicas de cada muestra en las que no se realizó el proceso de agregación a 50 $^{\circ}\text{C}$. La cantidad de chaperona precipitada junto con la G6PDH nativa, se sustrajo de la obtenida en las muestras que contenían a los agregados. La intensidad de cada banda se normalizó frente a la obtenido de una calle control del mismo gel, que contenía 1 μg de cada una de las proteínas del sistema.

3.7. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

3.7.1. Anisotropía de fluorescencia: Unión y liberación del péptido FT7.

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia emitida por ciertas moléculas denominadas fluoróforos. Cuando los electrones de estas moléculas absorben la energía proveniente de la radiación electromagnética a una determinada longitud de onda, éstos son excitados y pasan momentáneamente a orbitales de mayor energía, para posteriormente volver a relajarse. En este proceso de relajación, parte de esa energía es disipada en forma de calor y el resto lo hace en forma de luz de mayor longitud de onda (y por lo tanto de menor energía).

La anisotropía de fluorescencia se basa en el efecto que la luz polarizada posee al incidir sobre determinados fluoróforos, y en la diferente intensidad que la luz emitida posteriormente por estos posee a lo largo de los diferentes ejes de polarización. En disoluciones homogéneas, los fluoróforos se encuentran aleatoriamente orientados y, sólo aquellas moléculas cuyo momento dipolar se encuentre orientado correctamente con respecto al rayo de luz polarizada, serán capaces de absorberla y por lo tanto excitar sus electrones a niveles superiores de energía. Los fotones emitidos por la molécula durante el proceso de relajación, también poseerán un plano de polarización particular en relación a la molécula (Figura 3.10). El valor de polarización de esta emisión se describe en términos de anisotropía (r). Cuando el fluoróforo rota libremente antes de la reemisión de dichos fotones, el grado de polarización de la luz

emitida se reduce. Por lo tanto, el valor de anisotropía de emisión variará en función de la libertad de rotación de la molécula fluorescente, siendo menor cuanto mayor libertad de rotación tenga la molécula. En un ensayo de anisotropía, antes de interactuar con la muestra, el haz de luz se polariza con un polarizador en la componente vertical (V) u horizontal (H) de su onda electromagnética y los fotones emitidos se analizan también en estas orientaciones (Figura 3.10). La anisotropía de fluorescencia (r) de una molécula bajo unas determinadas condiciones, se expresa de la siguiente manera:

$$r = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2 G I_{VH}}$$

donde:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

Esta técnica se ha convertido en una herramienta muy útil para el estudio de la interacción entre diferentes proteínas, puesto que la anisotropía de fluorescencia de un determinado fluoróforo variará en función de la interacción de éste con otros compuestos, péptidos o macromoléculas del medio.

Esta técnica se utilizó para caracterizar la interacción (unión y liberación) de Hsc70 (sola o en complejo con Apg2 y Apg2 Δ AS) y del Hsc70_{V438F} con el péptido FT7 marcado con la sonda fluorescente 5-TAMRA. Los ensayos de unión se realizaron incubando t-FYQLALT (1 μ M) con Hsc70 (2, 4, 6 ó 8 μ M) o de los complejos Hsc70:Apg2 y Hsc70:Apg2 Δ AS, en presencia de ADP 0,1 mM, a 25 °C en tampón Hepes-KOH 40 mM (pH 7,6), KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM y DTT 2 mM. Los complejos entre Hsc70 y Apg2 fueron previamente formados en el mismo tampón, incubándolos en presencia de ATP 50 μ M durante toda la noche. Los ensayos de liberación se realizaron añadiendo ATP 0,2 mM junto con diferentes concentraciones de Apg2 (silvestre o Δ AS), sobre muestras de Hsc70 (1 μ M) previamente unida a t-FYQLALT (0,5 μ M), en el mismo tampón utilizado para los ensayos de unión.

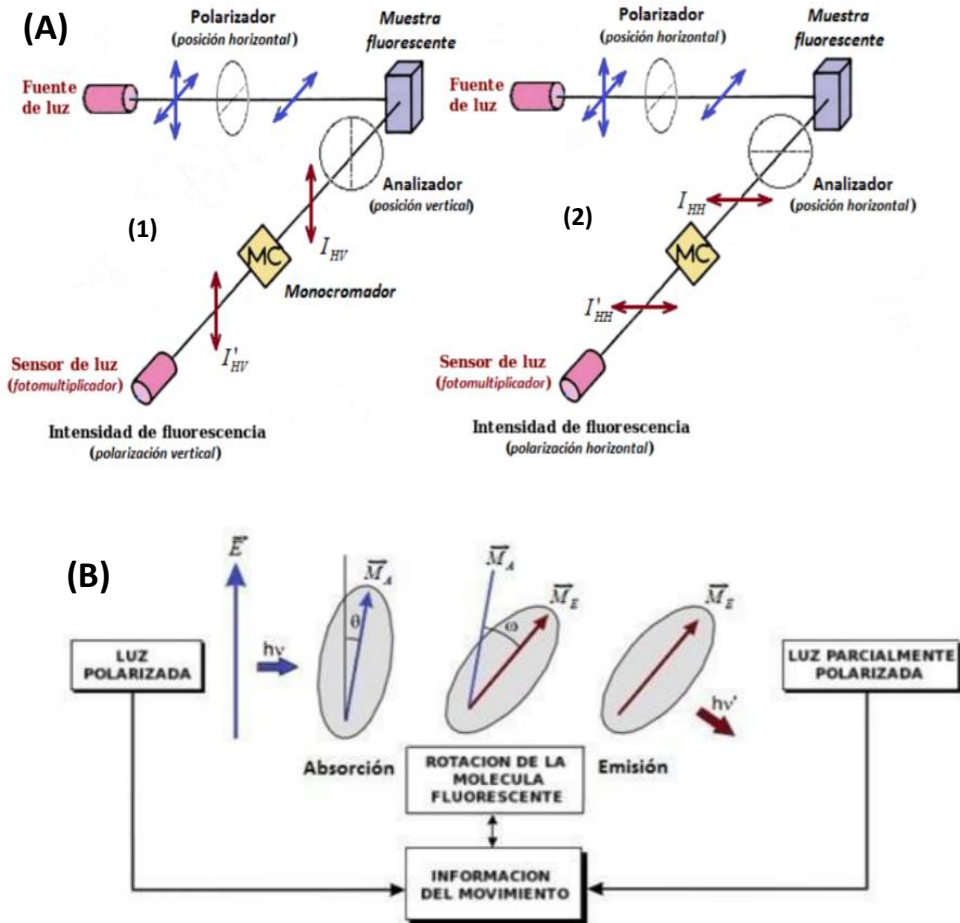


Figura 3.10: Anisotropía de fluorescencia. **A**, Esquema de un equipo típico de medida de la anisotropía de fluorescencia. En los ejemplos, la luz que llega a la cubeta de medida se polariza verticalmente (v) y la luz de fluorescencia emitida por la muestra es analizada tanto en su componente vertical I_{HV} (1) como en su componente horizontal I_{HH} (2). La intensidad de fluorescencia emitida se encuentra atenuada al pasar por el monocromador (al seleccionar la longitud de onda), por eso las intensidades finales medidas son I'_{HV} y I'_{HH} . **B**, Efecto de la rotación de una molécula sobre la polarización de la luz de fluorescencia emitida. El grado de rotación de la molécula depende de su libertad de movimiento y del medio en el que se encuentra. Cuanto mayor sea su velocidad de rotación, menor será la anisotropía de fluorescencia medida.

La anisotropía de las diferentes muestras se siguió de manera continua en un *espectrofluorímetro SLM8100* (Aminco), a 555 y 580 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente. En ambos casos, se utilizó una apertura de rendija (de entrada y de salida) de 8 nm. Para la obtención de la constante cinética aparente (K_{obs}) de unión o disociación entre el péptido y las chaperonas, los valores de anisotropía se ajustaron a ecuaciones exponenciales simples. De la representación de las K_{obs} de unión frente a la concentración de Hsc70 utilizada en cada caso, pudimos obtener las constantes de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}).

3.7.2. Marcaje específico con sondas fluorescentes

Hoy en día existe una gran variedad de sondas fluorescentes artificiales con diferentes propiedades espectrales, que nos permite marcar macromoléculas, bien porque carecen de fluorescencia intrínseca o para poder distinguirlas fácilmente de entre otros compuestos en una mezcla homogénea. En este trabajo se emplearon las sondas *Alexa Fluor NHS ester* (o succinimidyl ester) (Molecular Probes™ Alexa Fluor™. Thermo Fisher Scientific) para el marcaje de las chaperonas. En concreto, utilizamos la Alexa Fluor 488 para marcar el grupo amino terminal (NH_2 -R) de Apg2 (Figura 3.11).

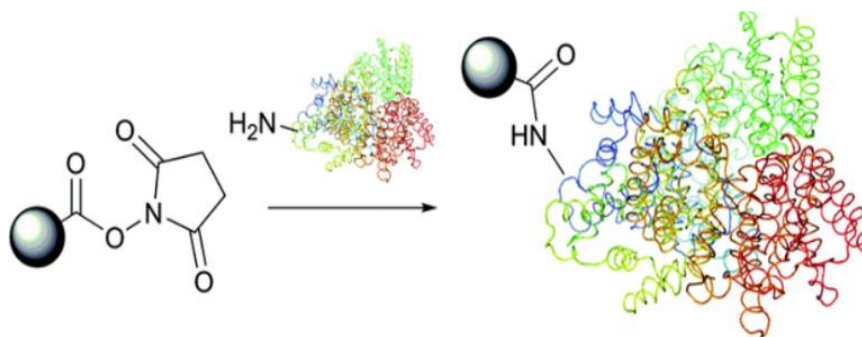


Figura 3.11. Ejemplo del marcaje de una proteína con una sonda fluorescente en uno de sus grupos amino. En esta Tesis la sonda fluorescente utilizada fué la *Alexa Fluor NHS* (o succinimidyl éster) 488 para marcar Apg2 en su grupo amino terminal.

Estas sondas se encuentran entre las más utilizadas en el campo de la Biología Molecular ya que, además de abarcar todo el espectro visible, poseen una gran capacidad de absorción, un rendimiento cuántico alto y una gran fotoestabilidad. Son solubles en agua y estables en un rango amplio de pHs (4-10).

La sonda fue disuelta previamente en DMSO a una concentración final de 10 mM y después mezclada con la proteína (en proporción 1:1) en tampón K_3PO_4 20 mM (pH 6,4), NaCl 30 mM y β -Me 1 mM. La proteína fue previamente dializada frente al mismo tampón para favorecer la eficiencia del marcaje. La mezcla sonda-proteína se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas en oscuridad, tras lo que se eliminó el exceso de sonda haciendo pasar la muestra por una columna PD-10 (GE Healthcare) previamente equilibrada con el tampón adecuado (tampón final de la purificación de cada proteína). Finalmente, se concentró la proteína y se suplemento con 10 % de glicerol antes de ser alicuotada y congelada. La eficiencia del marcaje fue estimada en espectrofotómetro Cary 3Bio midiendo la absorbancia de la muestra a 495 nm, la longitud de máxima absorción de la Alexa488:

$$\frac{A\lambda \times \text{factor de dilución}}{\epsilon \times \text{concentración de proteína} \left(\frac{mg}{ml}\right)} = \frac{\text{moles sonda}}{\text{moles proteina}}$$

Donde el coeficiente de extinción molar (ϵ) de la *Alexa Fuor 488* es $73.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.7.3. Medidas de cinética rápida mediante flujo detenido (“Stopped-flow”).

La técnica de flujo detenido (en inglés *Stopped Flow*) es una técnica espectroscópica que nos permite medir cinéticas de reacciones en solución que tienen lugar en periodos muy cortos de tiempo (prácticamente en lo que tardan los componentes en mezclarse). En esta técnica, los componentes de la reacción son primero arrastrados por jeringas a una cámara de mezcla desde donde, tras unos pocos milisegundos (tiempo muerto), pasan a la celda de medida (Figura 3.12). En este punto, un pistón hace que el flujo se detenga repentinamente a la vez que dispara el dispositivo de medición. El cambio en la absorbancia y/o fluorescencia que tiene lugar como resultado de la reacción es monitorizado en el tiempo. El tiempo muerto es el tiempo transcurrido entre el final de la mezcla de las dos disoluciones y el comienzo de la observación de la cinética de la reacción, y habitualmente es de 1 a 2 milisegundos, aunque hoy en día existen nuevos dispositivos con tiempos muertos de 0,3 a 0,6 ms.

En este trabajo se utilizó la técnica de flujo detenido para medir el intercambio de nucleótido que Apg2 (y sus mutantes) promueve en Hsc70, ya que tiene lugar en tiempos muy cortos de tiempo y su velocidad aumenta cuanto mayor es la concentración de Apg2 utilizada. Tras la incubación previa a temperatura ambiente de Hsc70 con MABA-ADP (0,48 μM) (Jena Bioscience), estos complejos fluorescentes

fueron mezclados rápidamente con ADP o ATP (168,5 μM) en presencia de diferentes concentraciones de Apg2 o de los mutantes Apg2 ΔAS y Apg2 ΔC (de 0 a 3 μM). La reacción se llevó a cabo en tampón Hepes-KOH 40 mM (pH 7,6), KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM y DTT 2 mM. El intercambio de MABA-ADP por ADP o ATP provocó un descenso en la señal de fluorescencia que fue medido en un equipo SFM 300/MOS 550 (BioLogic, Grenoble, France), y las constantes cinéticas fueron calculadas con ayuda del software Bio-Kine32 v4.65 (BioLogic).

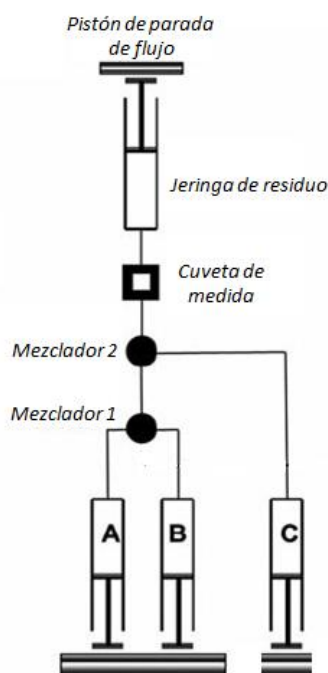


Figura 3.12: Esquema de un equipo de medida típico de stopped flow. En el esquema se detalla un equipo de medida de tres jeringas, similar al utilizado en nuestros experimentos, donde Hsc70(MABA-ADP) (jeringa C) era mezclado rápidamente (mezclador 2) con una disolución (mezclador 1) que contenía ADP y Apg2+ADP (jeringas A y B respectivamente), o ATP y Apg2 (jeringas A y B). La mezcla resultante pasaba a la cubeta de medida donde, tras la activación del pistón de parada, el flujo del sistema se detenía y el descenso de fluorescencia debido al intercambio de MABA-ADP por ADP o ATP se monitorizaba a tiempo real.

3.7.4. Dispersión de luz.

Este método se basa en la capacidad que la luz electromagnética tiene para interactuar “de manera no eficiente” con las partículas de una disolución acuosa, en este caso con las proteínas. Cuando la longitud de onda de la luz incidente es mayor al tamaño de partícula con la que interactúa, esta energía no puede ser absorbida por la muestra (sus frecuencias no coinciden y por lo tanto los electrones de la muestra no pueden ser excitados a niveles de mayor energía), y es devuelta al medio en forma de dispersión (dispersión elástica de Rayleigh) (Figura 3.13). De esta manera, la luz dispersada mantiene toda la energía, y su longitud de onda y frecuencia no varían. Cuando la muestra en estudio va creciendo en tamaño (cosa que ocurre durante el

proceso de agregación proteica), la turbidez del medio aumenta y por lo tanto la dispersión detectada también es mayor.

Mediante este método podemos seguir de una manera directa y sencilla, el proceso de agregación de las proteínas desnaturalizadas térmica o químicamente, así como la protección de las mismas de dicho proceso de agregación en presencia de las chaperonas moleculares.

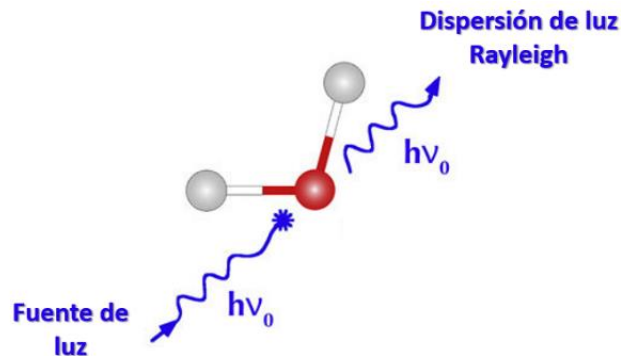


Figura 3.13: Dispersión de luz Rayleigh. Cuando la longitud de onda de la radiación electromagnética con la que se irradia una molécula es mayor al tamaño de ésta, la energía no puede ser absorbida por sus electrones y “rebota” devolviéndose al medio en cualquier dirección, manteniendo toda su intensidad y su energía. A este fenómeno se le conoce como dispersión elástica de la luz y es muy útil para medir, a tiempo real, la formación de agregados proteicos.

En este trabajo se siguió la agregación de la luciferasa y su protección por Apg2. LUC (0,1 μM) fue incubada a 42 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, en ausencia o presencia de 0,4 ó 2 μM de Apg2 o Apg2 ΔAS en tampón Hepes-KOH 40 mM (pH 7,6), KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, DTT 2 mM, ATP 2 mM, PEP 3 mM y 20 ng/ml de PK. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro Fluorolog (Jobin Ibon) a la longitud de onda de 320 nm de excitación y de emisión, y con una apertura de rendijas de 8nm.

3.7.5. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular, abreviado CD del inglés “Circular Dichroism”, es una técnica espectroscópica de absorción que nos permite obtener información acerca de la estructura de macromoléculas biológicas. La luz utilizada como fuente se encuentra polarizada y las muestras a analizar, además de poder absorber, deben ser ópticamente activas (es decir, moléculas quirales). La teoría Biot y Fresnel propone que un rayo de luz polarizada en un plano, se encuentra formada por dos componentes polarizados circularmente: uno a la derecha y otro a la izquierda. Estos componentes se encuentran

en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio quiral, cada uno de estos componentes es absorbido por la muestra de manera diferente y, tras volver a combinarse, la diferente magnitud de absorción (absortividad molar) sufrida y el desfase entre ambos, provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α (α), generando así luz polarizada elípticamente (Figura 3.14). La rotación del plano y la absorción diferencial de los componentes polarizados circularmente (dicroísmo circular) varía con la longitud de onda, lo que permite obtener espectros de CD. La diferencia de absortividad molar entre las dos componentes circularmente polarizadas de la luz, se expresa como la elipticidad molar $[\theta]$, siendo θ el ángulo de elipticidad generado por la muestra.

En la región del UV lejano (de 180 a 250nm) los enlaces peptídicos son los grupos ópticamente activos de las proteínas. La asimetría de estos enlaces se debe a la disposición espacial de la cadena principal de la macromolécula, por lo que la señal de dicroísmo circular en esta zona espectral se puede interpretar en términos de los diferentes tipos de estructura secundaria presentes en la proteína (Tabla 3.7).

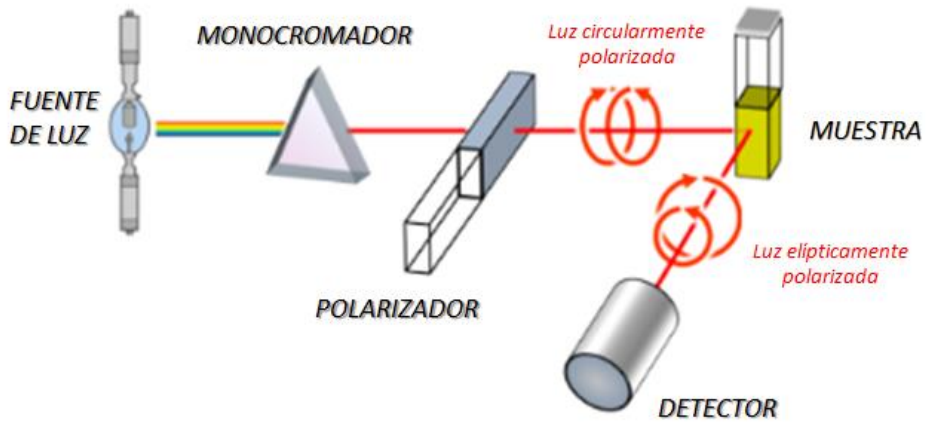
TABLA 3.7. Relación entre la longitud de onda de absorción y estructura secundaria de las proteínas. Se detallan las longitudes de onda a las que se encuentran los máximos y mínimos de elipticidad característicos de los distintos tipos de estructuras secundarias en proteínas

CONFORMACIÓN	$\lambda_{\text{máx. } \theta}$ (nm)	$\lambda_{\text{mín. } \theta}$ (nm)
α -hélice	190	208, 222
Estructura β	195	217
Estructura al azar (colágeno desnaturalizado)	212	195

Mediante esta técnica, además de poder determinar las diferentes contribuciones de estructura secundaria de la proteína, podemos también detectar posibles cambios estructurales y de estabilidad de la misma.

En este trabajo se ha utilizado el dicroísmo circular para caracterizar la conformación y la estabilidad de Apg2 y de sus mutantes en diferentes condiciones.

A



B

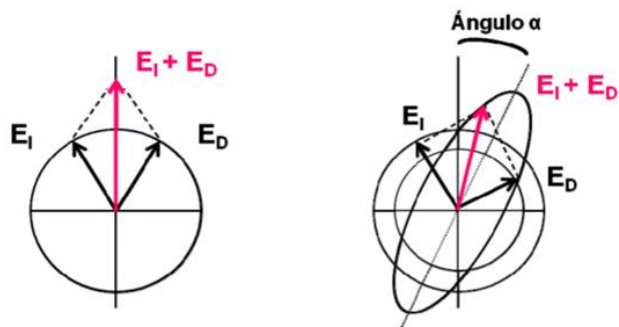


Figura 3.14: Dicroísmo circular. **A**, Esquema de un equipo típico de medida de Dicroísmo Circular. Tras seleccionar la longitud de onda de irradiación (monocromador), el haz de luz resultante es polarizado circularmente (polarizador) y, tras atravesar la muestra y ser absorbido por la misma, su polarización cambia y es emitido en forma de luz elípticamente polarizada. **B**, Variación de los componentes de un haz de luz polarizada en un plano tras atravesar una muestra ópticamente activa. Antes de llegar a la muestra (1), los componentes se encuentran polarizados circularmente (uno a la derecha y el otro a la izquierda) y en fase. Tras atravesar la muestra se vuelven a combinar, pero debido a la diferencia en la absorción de cada componente por parte de los solutos, lo hacen fuera de fase, generando así una onda polarizada elípticamente (2). Esta elipticidad definirá las características de la muestra a una determinada longitud de onda.

3.7.5.1. Espectros de Dicroísmo Circular

Para la obtención de los espectros de CD, las muestras fueron preparadas en diferentes tampones en función de las condiciones de medida requeridas. Los espectros de las proteínas en su forma *apo* (sin nucleótido) fueron realizados en fosfato potásico 10 mM (pH 7,6) a una concentración de 2,5 μ M de proteína. Para determinar los posibles cambios estructurales de las proteínas en presencia de nucleótido, los espectros se realizaron en tampón Hepes-KOH 15 mM (pH 7,6), KOAc 50 mM, Mg(OAc)₂ 2 mM y DTT 2 mM. La concentración de proteína en este caso fue de 5 μ M y se añadieron 0,5 mM de ADP o ATP γ S (análogo no hidrolizable del ATP) (Sigma-Aldrich). Las medidas se realizaron a 25 °C en un espectropolarímetro Jasco J-8.100 (Jasco, Tokio, Japon) equipado con un Peltier para el control de la temperatura. Se promediaron 20 acumulaciones de los espectros.

3.7.5.2. Rampas de temperatura

Las muestras se midieron en las mismas condiciones que en el apartado anterior. Se midió la elipticidad de las muestras a 222 nm en un rango de 20 a 80 °C de temperatura, calentando a 1°C/min.

3.8. SPR

La resonancia de plasmón superficial (abreviado SPR, del inglés *Superficial Plasmon Resonance*) es un fenómeno óptico que tiene lugar cuando la luz electromagnética interactúa con una superficie fina de metal. Cuando el haz de luz incide sobre dicha superficie, se produce una excitación colectiva de los electrones deslocalizados que forman la banda de conducción del metal (plasmones); como consecuencia, parte de esta energía es absorbida y transmitida en forma de resonancia a través de la superficie metálica (Resonancia del Plasmón de Superficie). En un equipo típico de SPR, esta fina placa metálica se encuentra situada entre una lámina de vidrio y el medio líquido que contiene la muestra a analizar. A su vez, la lámina de vidrio se encuentra unida a la base de un prisma de vidrio que actúa como monocromador del haz de luz incidente. La placa metálica es irradiada por la parte que se encuentra en contacto con el vidrio, y cuando la luz incidente que atraviesa el prisma es refractada por la lámina de vidrio a ángulos superiores al denominado ángulo de reflexión crítico, parte de su energía es capaz de interactuar con el plasmón de la placa metálica, el cual entra en resonancia y transmite dicha energía al medio líquido, donde es gradualmente disipada (onda evanescente) debido al menor índice de refracción que éste posee con respecto al vidrio. Al perder parte de la energía, la luz reflejada por la lámina de vidrio será

detectada a un ángulo diferente. La propagación de esta onda energética es muy sensible a la composición química de dicho medio líquido por lo que, variaciones en su

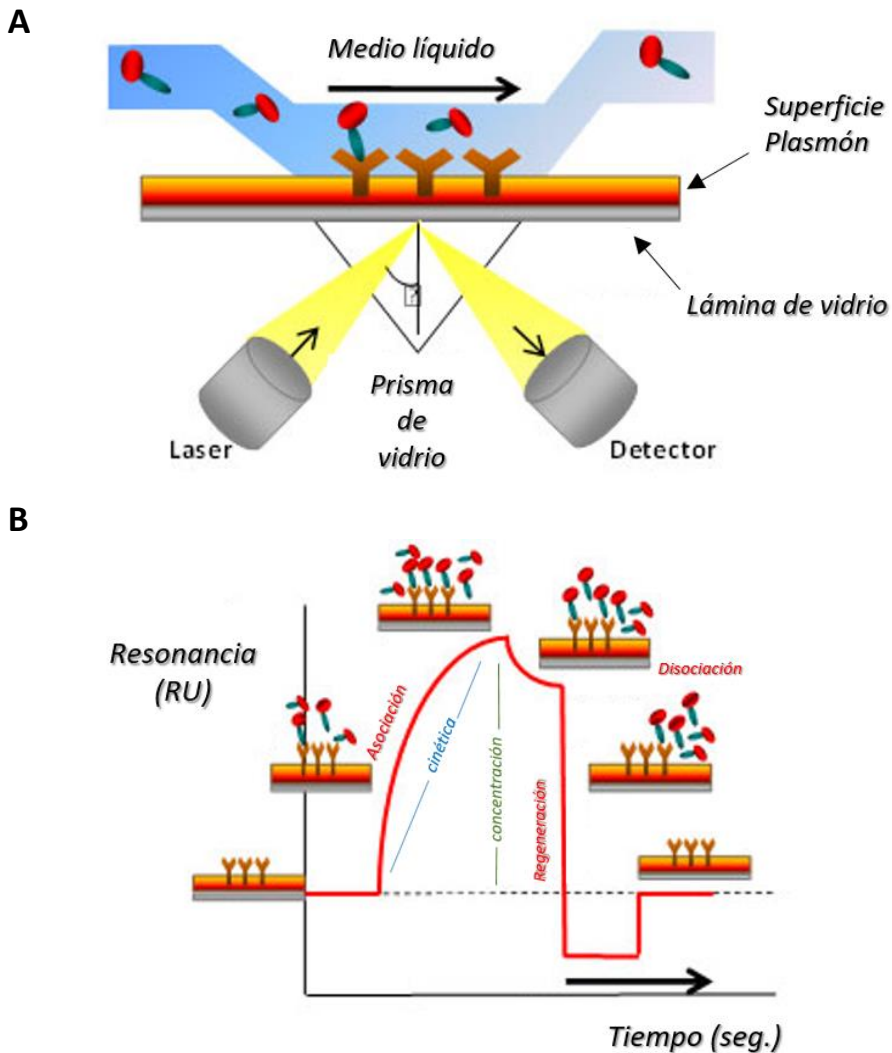


Figura 3.15: Medidas de resonancia de plasmón superficial. A, Componentes de un sistema de medida de SPR. Al irradiar la lámina de vidrio, parte del haz de luz es reflejado y detectado por detector del equipo, y parte atraviesa la lámina de vidrio para ser absorbida por los electrones que forman la banda de conducción de la lámina de metal (Plasmón) a la que se encuentra unida. La energía absorbida es transmitida en forma de resonancia a través de toda la lámina de metal para disiparse después a lo largo del medio líquido con el que se encuentra en contacto (onda evanescente), debido a su diferente índice de refracción. Dependiendo de las características del medio líquido y de los componentes que

se hallen anclados a la lámina del metal (proteínas en nuestro caso), el índice de refracción del medio variará y, por lo tanto, también lo hará la transmisión de la onda de resonancia. Como consecuencia, la intensidad de la luz reflejada detectada por el equipo será diferente. B, Ejemplo de un sensograma correspondiente a una cinética de unión y disociación entre dos proteínas. Cuando la proteína circulante en el medio líquido interactúa con la macromolécula anclada al chip metálico del equipo, la señal de resonancia se ve alterada hasta alcanzar un máximo de interacción (saturación del chip). En este punto, la disociación entre ambas (lavado) provocará un descenso en esta señal hasta alcanzar un nuevo equilibrio. Los tiempos de asociación y de disociación marcarán la cinética de la interacción, permitiéndonos obtener diferentes parámetros cinéticos como, por ejemplo, la constante de afinidad entre ambas proteínas. Por otro lado, cuanto mayor sea la concentración de proteína añadida al medio, mayor será la variación total de resonancia durante la asociación.

composición y por lo tanto de su índice de refracción, alterará el ángulo de resonancia detectado por el equipo. El cambio en el ángulo de resonancia se indica en unidades de respuesta (RU).

Esta técnica nos permite seguir la interacción entre dos moléculas a tiempo real. Para ello, una de las moléculas es previamente anclada a la placa metálica por el lado contrario al del haz de luz incidente (medio líquido). Cuando se hace pasar una fase móvil que contiene la otra macromolécula, y ambas interactúan, se produce un cambio en el índice de refracción del medio y por lo tanto en el ángulo de resonancia detectado por el equipo. Estas interacciones pueden seguirse en tiempo real midiendo los cambios en la intensidad de la luz reflejada, la cual se registra en un sensograma.

En este trabajo se utilizó la técnica de SPR para determinar las constantes de afinidad de los complejos formados entre Hsc70 y Apg2 (silvestre y sus dos mutantes Δ AS y Δ C). Para realizar estos experimentos se utilizó el mutante Hsc70_{STREPTAG}. Esta proteína se inmovilizó en un *Chip CM5* (GE Healthcare) previamente preparado con el anticuerpo monoclonal *StrepMAB-Immo* (IBA Lifesciences), capaz de detectar la cola de estreptavidina fusionada a Hsc70. Se inyectaron concentraciones crecientes (0,01 a 10 μ M) de Apg2 (y de sus mutantes), previamente dializada contra el tampón Hepes-KOH 40 mM (pH 7,5), KCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM y Tween 20 al 0,0025 %). Antes de inyectar cada nueva concentración de proteína, se lavó la celda con una disolución de NaCl 1M para eliminar los posibles restos de la carga anterior. Las medidas se realizaron a 25 °C, a un flujo de 30 μ l/min. Para los experimentos en presencia de nucleótido, se añadió

ATP o ADP 2 mM, previamente purificados. En todos los casos se sustrajeron la señal del tampón y la de Apg2 sola (en ausencia de Hsc70). Las constantes de afinidad (K_D) se obtuvieron mediante la representación de las R_{us} máximas obtenidas, frente a la concentración de Apg2 añadida en cada caso, ajustando los datos experimentales a una ecuación hiperbólica de tipo “unión a ligando”. Las medidas se hicieron en un equipo *Biacore 3000 system* (GE HHealthcare).

3.9. DIFRACCIÓN DE RAYOS X A BAJO ÁNGULO (SAXS)

Las medidas de SAXS y el procesamiento de los datos obtenidos se han realizado en colaboración con el Dr. Marcelo E. Guerin del CiC Biogune y el Dr. David Albesa del Instituto Biofisika.

Debido a los requerimientos estrictos de pureza de las muestras en los experimentos de SAXS, los protocolos de purificación de los complejos y de las proteínas en solitario se optimizaron mediante esta técnica. Se utilizó la columna Agilent Bio SEC-5 300 Å (Agilent).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1. REACTIVACIÓN DE AGREGADOS PROTEICOS POR LAS CHAPERONAS HSC70, DNAJB1 Y APG2 HUMANAS

Esta Tesis aborda el estudio del replegamiento de agregados proteicos por chaperonas humanas por vez primera en el grupo de investigación. Por ello, inicialmente nos planteamos realizar una optimización de las condiciones de reactivación de agregados proteicos por parte de Hsc70 (HSPA8), DnaJB1 y Apg2 (HSPH4). La optimización se realizó en dos partes:

1. Se analizó inicialmente la dependencia de la reactivación de un sustrato proteico agregado con la concentración de los tres componentes del sistema de chaperonas.
2. Se estudió como las condiciones de agregación de dos sustratos modelo (G6PDH y luciferasa), empleados comúnmente en los estudios de replegamiento de agregados proteicos amorfos, afectaban a la capacidad desagregasa del sistema humano.

4.1.1.- Optimización de la concentración de chaperonas moleculares.

El conocimiento adquirido hasta el momento del estudio de la reactivación de agregados proteicos mediante el sistema de chaperonas bacteriano demuestra que para que tenga lugar de manera eficiente, la relación entre la concentración de los diferentes componentes del sistema de chaperonas debe encontrarse equilibrada (Acebron et al 2008 y 2009), de manera que la colaboración entre éstos sea rápida y eficiente, pues de ello depende la supervivencia del organismo bajo situaciones de estrés en las que la demanda y la síntesis de estas proteínas se encuentra incrementada.

Inicialmente, se realizaron ensayos de reactivación de agregados de G6PDH a diferentes concentraciones de cada uno de los tres componentes del sistema de chaperonas humano (Hsc70, DnaJB1 y Apg2), manteniendo los otros dos a concentración constante (Figura 4.1).

4.1.1.1. Hsc70.

En primer lugar, se estudió la reactivación de los agregados de G6PDH a diferentes concentraciones de Hsc70. Para ello, se realizaron ensayos con agregados de G6PDH 10 μM formados tras la desnaturalización de la proteína mediante incubación a 50°C,

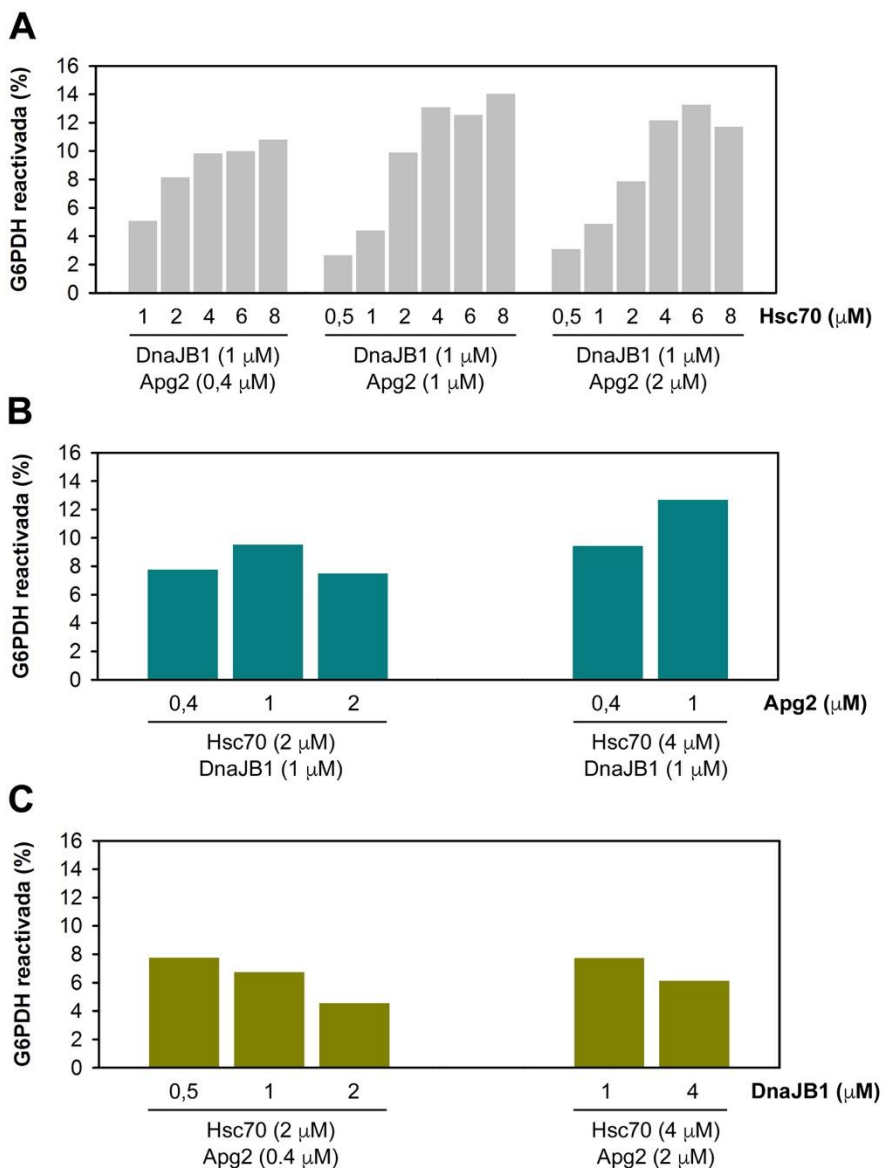


Figura 4.1: Reactivación de agregados de G6PDH por el sistema de chaperonas humanas: efecto de la concentración de Hsc70 (A), Apg2 (B) y DnaJB1 (C). Los agregados de G6PDH fueron reactivados durante 2 horas a 30°C por combinaciones de Hsc70, DnaJB1 y Apg2 a diferentes concentraciones.

durante 30 minutos. Estos agregados se estabilizaron durante 30 minutos a 30°C, y se incubaron en presencia de las diferentes combinaciones de chaperonas. Las concentraciones empleadas fueron: Hsc70 (0,5, 1, 2, 4, 6, y 8 μM), manteniendo DnaJB1 y Apg2 constantes a concentraciones 1:0,4, 1:1 o 1:2 μM . Transcurridos 120 min, se estimó la reactivación de la G6PDH midiendo su actividad en las diferentes muestras y comparándolas con la actividad de un control de proteína nativa (Figura 4.1A).

Los resultados obtenidos muestran que la reactivación máxima se alcanza a concentraciones entre 2 y 4 μM de Hsc70 en todos los casos, manteniéndose constante a partir de este punto.

4.1.1.2. Apg2.

Seguidamente se realizó un ensayo similar en el que se varió la concentración de Apg2 en el medio (0,4, 1 y 2 μM). Los ensayos se llevaron a cabo manteniendo las concentraciones de Hsc70 y DnaJB1 constantes, a dos relaciones molares diferentes 2:1 y 4:1. Del mismo modo que anteriormente, se siguió la reactivación de G6PDH agregada, tras 90 minutos de incubación con las chaperonas (Figura 4.1B).

Se observó que al incrementar la concentración de Apg2, el porcentaje de reactivación aumentaba inicialmente, pero a concentraciones elevadas de Apg2 con respecto a las concentraciones de los otros dos componentes del sistema (especialmente a las concentraciones Hsc70 2 μM y DnaJB1 1 μM), la reactivación de la G6PDH agregada fue menos eficiente. Estos resultados indican que el sistema de chaperonas humanas es más eficaz en la reactivación de este sustrato a concentraciones de Apg2 entre 0,4-1 μM .

4.1.1.3. DnaJB1

En paralelo a los ensayos anteriores, se estudió como la variación en la concentración de DnaJB1 afectaba a este proceso. Para ello, se escogieron dos relaciones molares de Hsc70:Apg2: una en la que ambas estuviesen a bajas concentraciones, para poder observar mejor el efecto del incremento de la concentración de DnaJB1, y otra a las concentraciones seleccionadas tras los experimentos mostrados anteriormente (4 y 2 μM para Hsc70 y Apg2, respectivamente). La reactivación de la G6PDH se siguió, tras una incubación de 45 minutos a 30°C en este caso. Los resultados muestran que las concentraciones de DnaJB1 superiores a 1 μM inducen una inhibición de la reactivación de agregados proteicos.

En resumen, se decidió que los rangos de concentraciones de los componentes del sistema de chaperonas humano a los cuales se obtiene una actividad replegadora óptima fueron 2-4 μM Hsc70, 0,5-1 μM DnaJB1 y 0,4-1 de Apg2. Debe mencionarse que los porcentajes de reactivación observados con los agregados de G6PDH empleados en este apartado son bajos (entre el 10 y 20 % de proteína replegada). En comparación, el sistema de chaperonas bacteriano formado por ClpB y DnaK/DnaJ/GrpE puede reactivar cantidades entre el 70 y 80% con el mismo tipo de agregados (observaciones sin publicar del grupo de investigación), lo que indica la menor capacidad reactivadora del sistema de chaperonas humano como ya han observado otros autores (Rampelt et al. 2012). Como se demostrará a continuación, los agregados de G6PDH formados a 10 μM son demasiado estables para el sistema humano que, sin embargo, es capaz de replegar agregados formados a menor concentración con mayor eficacia.

4.1.2.- Impacto de las condiciones de agregación de sustratos modelo en el replegamiento *in vitro* inducido por las chaperonas humanas

Para generar los distintos tipos de agregados proteicos, se han utilizado dos sustratos modelo: Luciferasa (LUC) y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), que han sido ampliamente estudiados con el sistema de chaperonas bacteriano (Acebron et al. 2008; Acebron et al. 2009; Martin et al 2014; Fernandez-higuero et al 2018). Con la idea de poder caracterizar de la manera más completa posible la capacidad reactivadora del sistema de chaperonas humano Hsc70/DnaJB1/Apg2, se generaron diferentes tipos de agregados sometiendo cada una de estos dos sustratos proteicos a diversas condiciones desnaturalizantes.

4.1.2.1.- Glucosa 6-fosfato Deshidrogenasa (G6PDH)

La utilización de la G6PDH como sustrato permite una mayor variación en las condiciones de ensayo. Los estudios previos realizados en nuestro laboratorio nos permiten generar agregados de esta proteína con diferentes características en función de su concentración y de la temperatura de agregación utilizadas (Acebrón et al. 2008; Fernández-Higuero et al. 2018). Tal y como describe el protocolo utilizado por nuestro laboratorio (sección 3.5.2.2.1 de Materiales y Métodos), la agregación de G6PDH se induce mediante la incubación durante 30 minutos a 50°C u 80°C, y una posterior estabilización de los agregados generados, durante otros 30 minutos a 30°C. Posteriormente, estos agregados se diluyen a una concentración determinada en el tampón de ensayo, tras lo que se añaden las chaperonas y el ATP, y se incuba a 30°C para permitir la solubilización y replegamiento del sustrato. La reactivación del

agregado se analiza extrayendo alícuotas a diferentes tiempos y ensayando la actividad de la G6PDH como se indica en la sección 3.3.3.7.2 de Materiales y Métodos. La concentración de proteína y la temperatura de desnaturalización empleadas en el proceso de agregación tiene un gran impacto en el tamaño y conformación de los agregados (Acebron et al. 2009; Fernandez-Higuero et al. 2018).

4.1.2.1.1.- Efecto de la concentración de G6PDH.

Con la finalidad de optimizar la cantidad de G6PDH renaturalizada por el sistema formado por las chaperonas humanas, se realizaron diferentes ensayos en los que se variaron tanto la concentración de agregación de la G6PDH (2,5, 5 o 10 μM), como la concentración final de agregados añadida a la muestra (0,1, 0,2, 0,4 o 0,8 μM) (Figura 4.2).

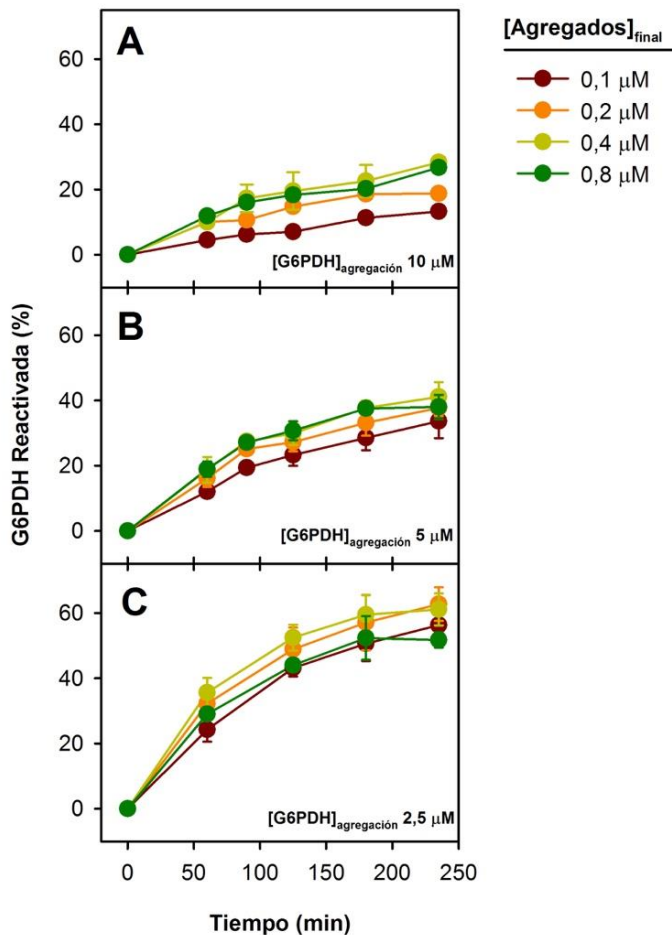


Figura 4.2 (página anterior): Efecto de las concentraciones de agregación y ensayo en el rendimiento de reactivación de agregados de G6PDH por el sistema de chaperonas humanas. La G6PDH fue agregada a 10 (A), 5 (B) y 2,5 μM (C) y posteriormente diluida a una concentración final de 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8 μM , según se indica en la figura, en el tampón de ensayo para analizar su reactivación por Hsc70/DnaJB1/Apg2 (2/1/0,4 μM).

Se observó un gran efecto de la concentración de agregación, de modo que concentraciones bajas favorecen la formación de agregados más manejables por el sistema de chaperonas humano, alcanzándose valores de replegamiento en torno al 60% del sustrato añadido inicialmente. En cuanto a la concentración del sustrato en el ensayo, la reactivación máxima de G6PDH se obtuvo alrededor de 0,4 μM de agregado a la muestra para todos los casos.

4.1.2.1.2.- Papel de la temperatura de agregación

Tal y como se describe en estudios anteriores, la temperatura de desnaturalización a la que se incubaba la G6PDH para inducir su agregación tiene un gran impacto en el rendimiento del ensayo de replegamiento (Acebron et al. 2009). Así, la agregación de la G6PDH a 50 o 80°C permite generar dos tipos de agregados que difieren en tamaño y en el número de residuos implicados en interacciones intermoleculares de tipo β (Acebrón et al. 2008; Fernández-Higuero et al. 2018). Con la finalidad de estudiar el efecto de la temperatura de agregación en la actividad replegadora del sistema Hsc70/DnaJB1/Apg2, se realizaron los ensayos de replegamiento empleando agregados de G6PDH formados a 2,5 μM y diferentes temperaturas de desnaturalización (50, 60, 70 y 80°C). Después, los agregados formados se diluyeron a una concentración final de 0,4 μM en las muestras de ensayo como se menciona anteriormente.

Los resultados obtenidos muestran que el sistema de chaperonas humanas es solamente capaz de replegar porcentajes significativos de G6PDH (en torno al 50-60%) cuando la agregación se llevó a cabo a 50°C. El porcentaje final de proteína replegada disminuyó aproximadamente 10 veces al aumentar la temperatura de agregación a 60°C. A temperaturas de agregación superiores, no se observó reactivación alguna por parte del sistema humano. Por comparación, el sistema bichaperona bacteriano formado por ClpB y DnaK/DnaJ/GrpE puede replegar agregados de G6PDH formados a 10 μM tanto a 50 como a 80°C con porcentajes cercanos al 80 y 50% respectivamente, lo que pone de manifiesto la menor eficacia del sistema humano.

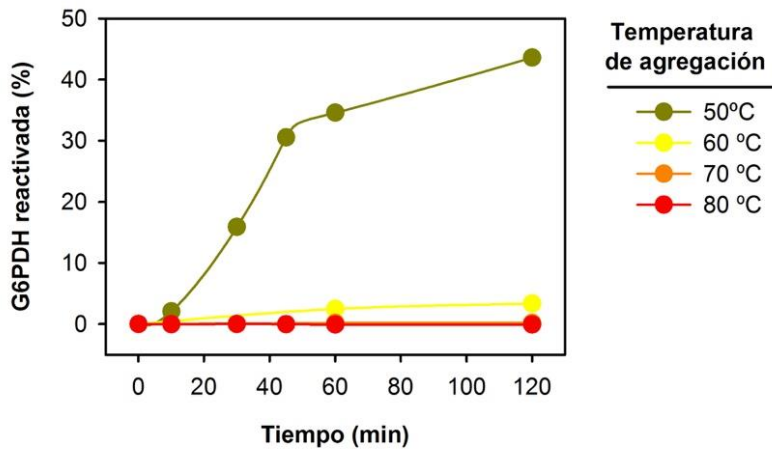


Figura 4.3: Efecto de la temperatura de agregación de G6PDH en la actividad replegadora del sistema de chaperonas humanas. La G6PDH ($2,5 \mu\text{M}$) fue incubada durante 30 min a 50, 60, 70 y 80°C , y posteriormente diluida a una concentración final de $0,4 \mu\text{M}$ en el tampón de ensayo para analizar su reactivación por Hsc70/DnaJB1/Apg2 ($2/1/0,4\mu\text{M}$).

4.1.2.2.- Luciferasa

La Luciferasa de *Photinus pyralis* es una proteína que se utiliza frecuentemente en experimentos de reactivación de agregados proteicos debido a que se desnaturaliza y agrega a temperaturas de choque térmico para las células (42°C) y a la facilidad con la que se cuantifica la cantidad de proteína recuperada mediante ensayos de quimioluminiscencia. Por otro lado, presenta características que dificultan su manejo en el laboratorio, como su tendencia elevada a adsorberse a superficies de plástico. Las características especiales que presenta este sustrato hacen que no sea fácil variar sus condiciones de agregación y, además, la reproducibilidad de los resultados de reactivación sea menor que para la G6PDH. Así, en esta Tesis solo se ha comparado la reactivación de agregados de Luciferasa formados utilizando dos métodos diferentes: desnaturalización en Urea y su posterior dilución, y agregación térmica (secciones 3.5.2.1.1 y 3.5.2.2.2 de Materiales y Métodos, respectivamente).

4.1.2.2.1.- Agregación tras desnaturalización en presencia de Urea 6 M

La Luciferasa ($2 \mu\text{M}$) forma agregados cuando se desnaturaliza en presencia de Urea a concentraciones entre 6 y 8 M, y el agente caotrópico se diluye posteriormente 100 veces en el medio. Como se observa en la Figura 4.4, estos agregados fueron fácilmente reactivados por el sistema de chaperonas humanas, obteniéndose porcentajes de

reactivación superiores al 80% en presencia de Hsc70/DnaJB1/Apg2, y alrededor del 40% cuando se emplearon Hsc70 y DnaJB1 en ausencia de Apg2. Por comparación, el sistema bacteriano homólogo formado por DnaK/DnaJ/GrpE es incapaz de reactivar estos agregados y depende de la presencia de ClpB (Miot et al. 2011; Zolkiewski 1999). Esto pone de manifiesto la mayor eficacia del sistema de reactivación de agregados proteicos basado en la Hsc70 humana.

4.1.2.2.2.- Agregación tras desnaturalización térmica.

Se llevaron a cabo experimentos de reactivación de agregados de Luciferasa formados tras su desnaturalización térmica a 42°C a tres concentraciones del sustrato diferentes para estudiar su efecto en el rendimiento del sistema de chaperonas humanas (Figura 4.5). Para ello, LUC fue desnaturalizada a 0,5 o 0,1 μM durante 30 minutos a 42°C, y se ensayó la reactivación de los agregados a una concentración final de 0,1 μM en ambos casos por Hsc70/DnaJB1 (2 y 1 μM , respectivamente) en presencia o ausencia de Apg2 (0,4 μM). Los porcentajes de reactivación fueron prácticamente nulos cuando la agregación ocurrió a 0,5 μM (Figura 4.5A), aumentando moderadamente hasta el 30% en el caso de agregados formados a 0,1 μM y solo en presencia del sistema de chaperonas completo (Figura 4.5B). Estos resultados demuestran el importante efecto de la concentración del sustrato en la estabilidad de los agregados formados.

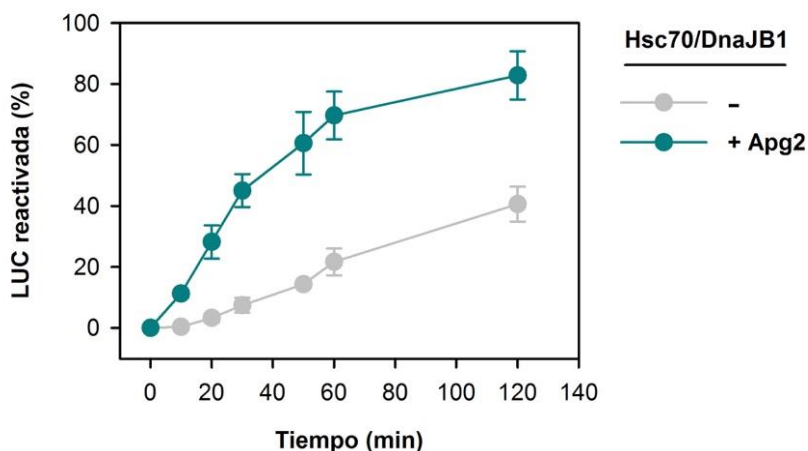


Figura 4.4: Reactivación de agregados de LUC formados tras su desnaturalización en presencia de urea 6 M. LUC (2 μM) fue incubada durante 30 min en presencia de Urea 6 M. Los agregados se formaron por dilución (100x) del agente caotrópico, siendo la concentración final de LUC de 0,02 μM . La reactivación se llevó a cabo por Hsc70 (2 μM), DnaJB1 (1 μM) en ausencia (círculos grises), y presencia de Apg2 (0,4 μM) (círculos azules).

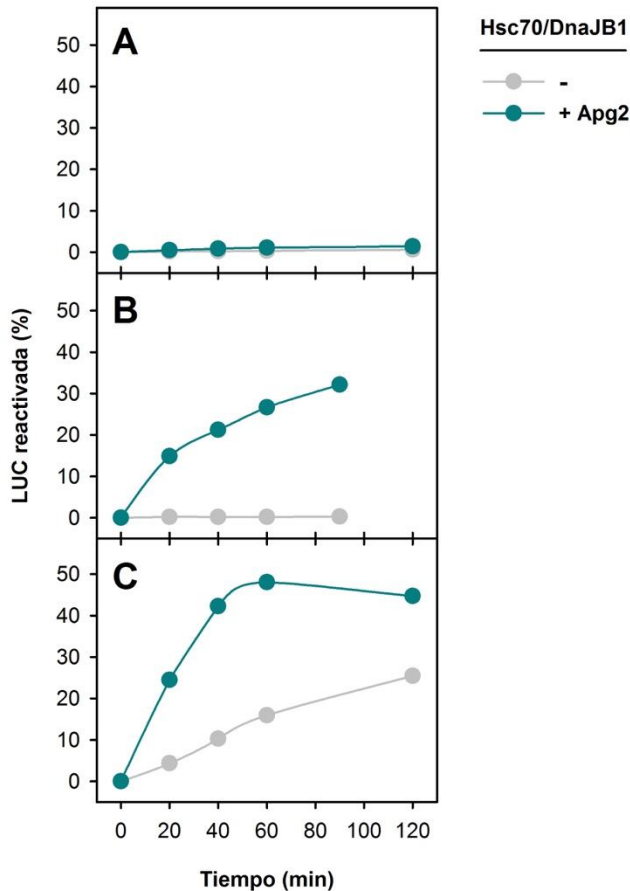


Figura 4.5: Reactivación de agregados de LUC formados tras su desnaturalización térmica. LUC fue desnaturalizada por incubación a 42°C durante 30 min a 0,5 (A), 0,1 (B) y 0,04 μM (C). La concentración final de LUC fue 0,1 μM en A y B, y 0,02 μM en C. La reactivación se realizó tras la adición de Hsc70 (2 μM), DnaJB1 (1 μM) (círculos grises), y Apg2 (0,4 μM) (círculos azules)

De cara a comparar la reactivación de este sustrato agregado mediante una desnaturalización térmica con la observada tras la desnaturalización/agregación inducida por agentes caotrópicos como la Urea, se realizó un ensayo en el que LUC se agregó a 0,04 μM durante 30 minutos a 42°C, tras lo que se diluyó a una concentración final de 0,02 μM como la empleada en los ensayos de la Figura 4.4. En este caso, la reactivación obtenida fue considerablemente mayor a la observada cuando la desnaturalización se realizó a 0,5 y 0,1 μM, siendo ésta del 25% y del 50%, en presencia de Hsc70/DnaJB1 en solitario o del sistema completo de chaperonas

Hsc70/DnaJB1/Apg2, respectivamente. Por otra parte, la reactivación de los agregados formados por desnaturalización térmica resultó menos eficaz que la observada en el caso de los agregados generados por el tratamiento con Urea.

En conclusión, los agregados mas adecuados para estudiar la capacidad replegadora del sistema de chaperonas humanas formado por Hsc70/DnaJB1/Apg2 son:

- agregados de LUC (2 μ M) formados tras la desnaturalización en presencia de Urea 6M a 30°C durante 30 min y posterior dilución a una concentración final de 20 nM;
- agregados de G6PDH (2,5 μ M) formados mediante la desnaturalización térmica por incubación a 50°C durante 30 min.

4.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA DE CHAPERONAS HUMANO POR APG2. PAPEL DEL SUBDOMINIO ACÍDICO (AS)

La primera divergencia estructural importante que diferencia a las proteínas de las familias Hsp110 y Hsp70 se encuentra localizada en el subdominio β del dominio de unión (SBD β) y consiste en la inserción de aproximadamente 80 residuos con un marcado carácter ácido y zonas ricas en residuos Q y P (Figura 4.6). En este apartado se presenta un estudio del papel que tiene este dominio, abreviado como AS (de “acidic subdomain”) en la regulación de la actividad chaperona de Hsc70, el representante constitutivo de la familia Hsp70 en humanos, por Apg2, uno de los tres miembros de la familia Hsp110. Para ello, se ha empleado un mutante denominado Apg2 Δ AS, en el que se han eliminado los residuos del 504 al 569 de Apg2. Es interesante mencionar que Hsp105, otro de los tres miembros de la familia Hs110 en humanos, se expresa como dos como isoformas, α y β , que se diferencian por la pérdida de un segmento localizado en el AS por ajuste alternativo. Se ha demostrado que la correcta localización citoplasmática y nuclear de Hsp105 α y Hsp105 β , respectivamente, depende de motivos NLS y NES localizados en sus subdominios AS y C-terminal (Saito et al. 2007, 2009). Por otro lado, Sse1p, una Hsp110 homóloga en levaduras, presenta un AS mucho más reducido (figura 4.6) y su delección no afecta a la interacción con Ssa1p ni a la actividad NEF pero reduce ligeramente la capacidad de desplegar un sustrato desplegado no agregado (Polier et al. 2008).

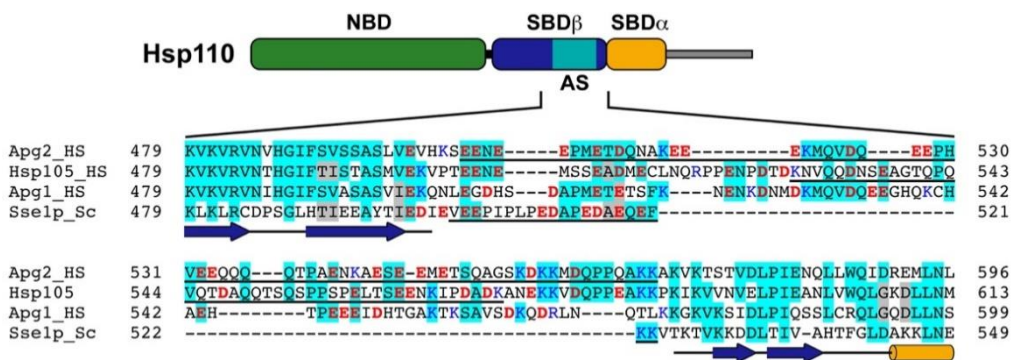


Figura 4.6: El dominio AS de Hsp110 humanas. Representación esquemática de la estructura de Apg2 y la alineación de secuencias del AS de Apg2, Hsp105 α y Apg1, los representantes de la familia Hsp110 en humanos, y Sse1p de levaduras. Los residuos idénticos se destacan en cian. Los residuos subrayados corresponden a la secuencia eliminada en Apg2 (este trabajo) y Sse1p y la

secuencia que la isoforma Hsp105 β carece debido a un ajuste alternativo. Los diferentes elementos estructurales de Sse1p se muestran mediante flechas azules, hojas β , y cilindros naranjas, hélices α .

4.2.1.- Caracterización estructural de Apg2 y Apg2 Δ AS

En primer lugar, se realizaron ensayos orientados a averiguar si la delección del AS, inserto en el SBD de Apg2, alteraba la estructura y/o estabilidad de la proteína. Para ello se emplearon las técnicas de dicroísmo circular (CD) y dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS).

4.2.1.1.- Dicroísmo circular

Se realizaron espectros e isotermas de desnaturalización de Apg2 Δ AS y se compararon con los datos obtenidos para Apg2 silvestre. Tanto los espectros como los perfiles de las rampas de temperatura fueron similares para ambas proteínas (Figura 4.7). El espectro de Apg2 muestra un contenido alto en hélices α . De modo similar el mutante de delección presenta un espectro dominado también por el contenido en hélices α , que podría ser ligeramente inferior en este caso. Observamos que la desnaturalización de Apg2 tiene lugar mediante una única transición altamente cooperativa centrada a $51,4 \pm 0,5$ °C, datos que coinciden plenamente con los descritos por otros autores (Raviol et al. 2006). De manera similar, la desnaturalización de Apg2 Δ AS ocurrió a través de una sola transición con una temperatura de transición (T_m) de $47,8 \pm 0,1$ °C, ligeramente inferior a la observada para Apg2 silvestre. En este caso, se observó además una segunda transición a partir de los 60°C, probablemente como consecuencia de la agregación de la proteína a altas temperaturas. Estos resultados sugieren que la delección del AS no altera significativamente el contenido de estructura secundaria en Apg2, ni su estabilidad y, por tanto, la conformación de la chaperona.

4.2.1.2.- SAXS

SAXS pertenece a la familia de técnicas de dispersión de rayos X que proporcionan información sobre el tamaño medio de las partículas y su forma en solución. Los experimentos se han realizado en un equipo que incorpora un HPLC acoplado en el que se realiza una cromatografía de tamizado molecular (SEC) de manera que los datos se colectan durante la elución de la muestra para las fracciones seleccionadas (Vestergaard 2016). Apg2 y Apg2 Δ AS presentaron perfiles de elución similares, siendo el volumen de elución de la proteína truncada ligeramente inferior (Figura 4.8A), lo

que indica que la delección del AS no afecta al estado oligomérico de la proteína. Estos ensayos y el procesamiento de los datos obtenidos se han realizado en colaboración con el Dr. Marcelo E. Guerin del CiC Biogune y el Dr. David Albesa del Instituto Biofisika.

La comparación de las curvas de dispersión Apg2 y Apg2 Δ AS indicó un nivel razonable de similitud ($\chi^2 = 2,6$), que se correlacionó bien con los parámetros estructurales estimados, como el radio de giro (R_g), la dimensión máxima (D_{max}), el volumen de Porod y el peso molecular (Tabla 4.1). Las reconstrucciones *ab initio* de Apg2 y Apg2 Δ AS predijeron envueltas alargadas con forma de V (Figura 4.8B). El ajuste simultáneo de las curvas de SAXS de Apg2 y Apg2 Δ AS durante el modelado implementado mediante MONSA, permitió la ubicación *ab initio* del AS que sobresale de la envuelta reconstruida de Apg2, lo que sugiere que este subdominio podría adoptar una conformación plegada globular (Figura 4.8B). Con el objetivo de encajar la estructura 3D de Sse1p de levadura, la única estructura cristalina de una Hsp110 disponible hasta la fecha, dentro de la envuelta de Apg2, realizamos una comparación entre las curvas de dispersión de Apg2 o Apg2 Δ AS obtenidas experimentalmente y la curva de dispersión calculada a partir de la estructura 3D de la proteína homóloga Sse1p de levadura (código PDB 3D2E) (Polier et al. 2008). Sin embargo, el resultado mostró un alto nivel de discrepancia (Apg2 frente a Sse1p $\chi^2 = 186,49$ y Apg2 Δ AS frente a Sse1p $\chi^2 = 27,0$). Esto no es sorprendente dado que Apg2 contiene 46 y 135 residuos más en los dominios AS y C-terminal, respectivamente, que la construcción de Sse1p utilizada para obtener la estructura cristalina.

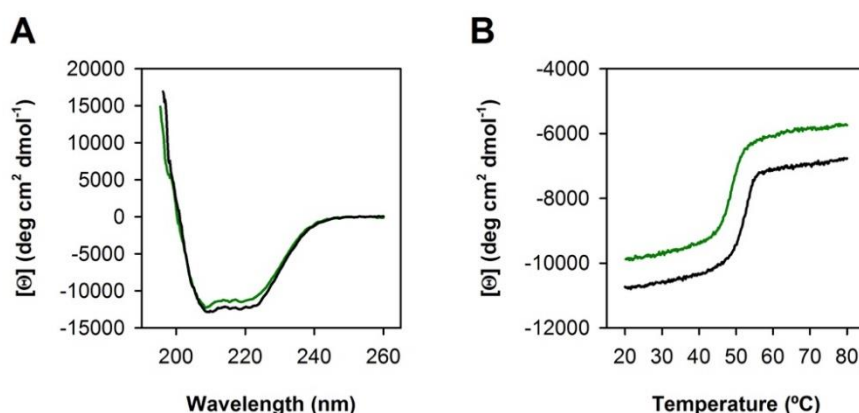


Figura 4.7: Caracterización de la estructura secundaria y desnaturalización de Apg2 y el mutante Apg2 Δ AS. A, espectros de CD de Apg2 (líneas negras) y Apg2 Δ AS (líneas verdes) en ausencia de nucleótidos. B, desnaturalización de

Apg2 (líneas negras) y Apg2 Δ AS (líneas verdes) siguiendo la elipticidad a 222 nm. Las rampas de temperatura se obtuvieron a 60°C/h, en ausencia de nucleótidos.

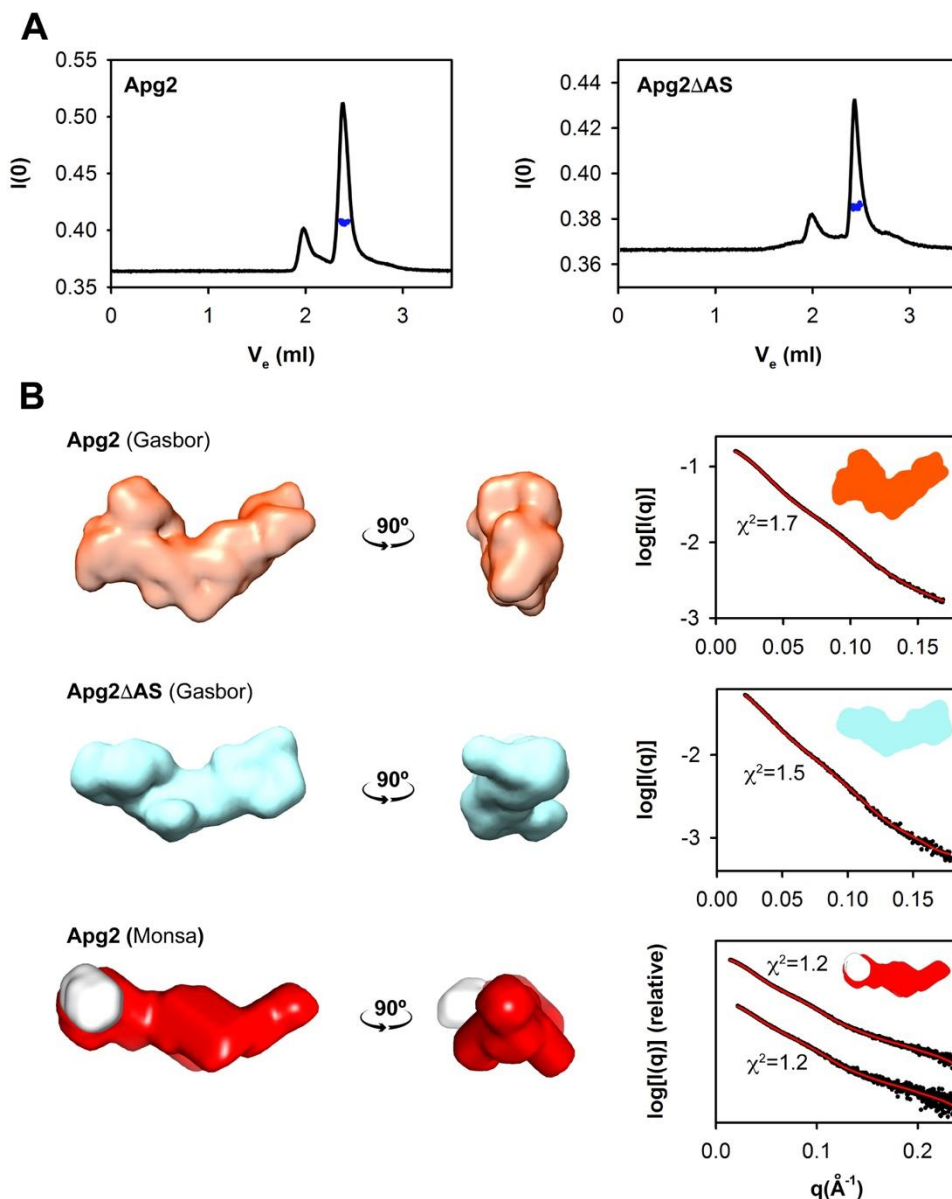


Figura 4.8: Caracterización estructural de Apg2 silvestre (líneas negras) y Apg2 Δ AS mediante SAXS. A, perfiles de elución de SEC para Apg2 y Apg2 Δ AS; los puntos azules indican las fracciones empleadas para realizar las medidas de SAXS. B, reconstrucción ab initio de las envoltas de Apg2 y Apg2 Δ AS empleando

GASBOR y MONSA, como se indica. Los datos de SAXS (puntos negros), el correspondiente ajuste a las envueltas predichas (líneas rojas) y los valores correspondientes de χ^2 se muestran en los paneles a la derecha.

En resumen, los resultados obtenidos tras el análisis por SAXS de Apg2 silvestre y el mutante de delección Apg2 Δ AS sugieren que el AS forma un subdominio globular en parte, que se proyecta hacia el exterior del SBD y que, por tanto, podría desarrollar una actividad regulatoria independiente del papel del SBD de Apg2. Además, esto hecho puede justificar que su eliminación no modifique significativamente la estabilidad de Apg2, como se ha observado en el apartado anterior.

Tabla 4.1: Parámetros de la recolección de datos de SAXS y procesado.

Parámetros	Apg2	Apg2 Δ AS
Equipo	Beamline B21 (DLS)	Beamline B21 (DLS)
Longitud de onda (Å)	1	1
Estrategia	SEC-SAXS	SEC-SAXS
Rango q (Å ⁻¹) ^b	0,010-0,35	0,010-0,35
Tiempo de exposición (sec/frame)	3	3
Concentración inyectada (mg ml ⁻¹)	10	7
Temperatura (K)	288	288
Parámetros estructurales*		
$I(0)$ (cm ⁻¹) [de P [®]]	0,184(3)	0,074(7)
R_g (Å) [de P [®]]	47,2(9)	44(4)
$I(0)$ (cm ⁻¹) (de Guinier)	0,1861(5)	0,0707(7)
R_g (Å) (de Guinier)	46,8(8)	43(2)
D_{max} (Å)	168	150
Volumen de Porod estimado (Å ³)	190,700	188,200
Volumen seco calculado de la secuencia (Å ³)	114,323	105,059
Determinación de la Masa Molecular		
Masa molecular [de V _c]	96(5) kDa	85(5) kDa
Calculada de la secuencia (monomérica)	94 kDa	87 kDa
Software empleado		
Reducción de datos primarios	GDA	GDA
Procesado de datos	ScÅtter	ScÅtter
Análisis <i>ab initio</i>	GASBOR / MONSA / SREFLEX	GASBOR / MONSA
Validación and promediado	DAMCLUST	DAMCLUST

* Los errores estimados hasta el último decimal se indican entre paréntesis

^b Rango q usado para el cálculo de la función P[®]

4.2.2. Cambios conformacionales de Apg2 y Apg2 Δ AS: efecto de la unión de nucleótidos.

Una de las características más importantes en la familia de chaperonas Hsp70 son los cambios conformacionales acoplados a su ciclo ATPasa (Chiappori et al. 2016; Daily y Gray 2009; English et al. 2017; General et al. 2014; Liu y Hendrickson 2007; Nicolaï et al. 2013; Smock et al. 2010; Zhuravleva et al. 2012). A diferencia de esto, la presencia de ATP o ADP en el medio no parece provocar modificaciones conformacionales importantes en Apg2 (Raviol, Bukau et al. 2006). Con la idea de averiguar si esta estanqueidad conformacional de Apg2 se mantenía tras la delección del AS, se realizaron diversos experimentos de CD, SEC y proteólisis en ausencia o presencia de nucleótidos de adenina.

4.2.2.1.- Dicroísmo circular

Se realizaron espectros y rampas de temperatura del mutante Apg2 Δ AS en sus estados APO, ADP y ATP, y se compararon con los obtenidos para la proteína silvestre. Para los ensayos en presencia de ATP se utilizó el análogo no hidrolizable ATP γ S. Tanto los espectros como los perfiles de desnaturalización de ambas proteínas fueron muy similares en todas las condiciones ensayadas (Figura 4.9), lo que demuestra que el dominio AS no influye en el ciclo conformacional de Apg2.

4.2.2.2.- Proteólisis

Con el objetivo de detectar posibles cambios conformacionales sutiles que no modifiquen significativamente la estructura secundaria ni terciaria de la proteína, se llevaron a cabo experimentos de proteólisis parcial controlada que pueden detectar los cambios de la accesibilidad de diferentes zonas de la proteína. Para ello, Apg2 y Apg2 Δ AS en sus estados apo, ADP o ATP, fueron tratadas con cantidades pequeñas de tripsina a diferentes tiempos de reacción (1, 5, 10 y 20 minutos). La digestión de Apg2 con tripsina no mostró diferencias significativas en las tres condiciones ensayadas (Figura 4.10A). La proteólisis de Apg2 generó dos fragmentos abundantes de aproximadamente 66 y 40 kDa y otros fragmentos minoritarios de menor masa molecular. En el caso de Apg2 Δ AS se observó una menor tasa de proteólisis de la proteína y, de modo similar a la proteína salvaje, no se observaron diferencias dependientes de nucleótido (Figura 4.10B). Se observaron los mismos fragmentos trípticos para el mutante de delección, excepto el fragmento de mayor masa que era más pequeño en este caso, lo que indica que debe contener el AS. El análisis por espectrometría de masas de muestras de Apg2 proteolizadas permitió identificar dos fragmentos de masas de 27.321,5 y 31.107,5 Da, que se corresponden con segmentos

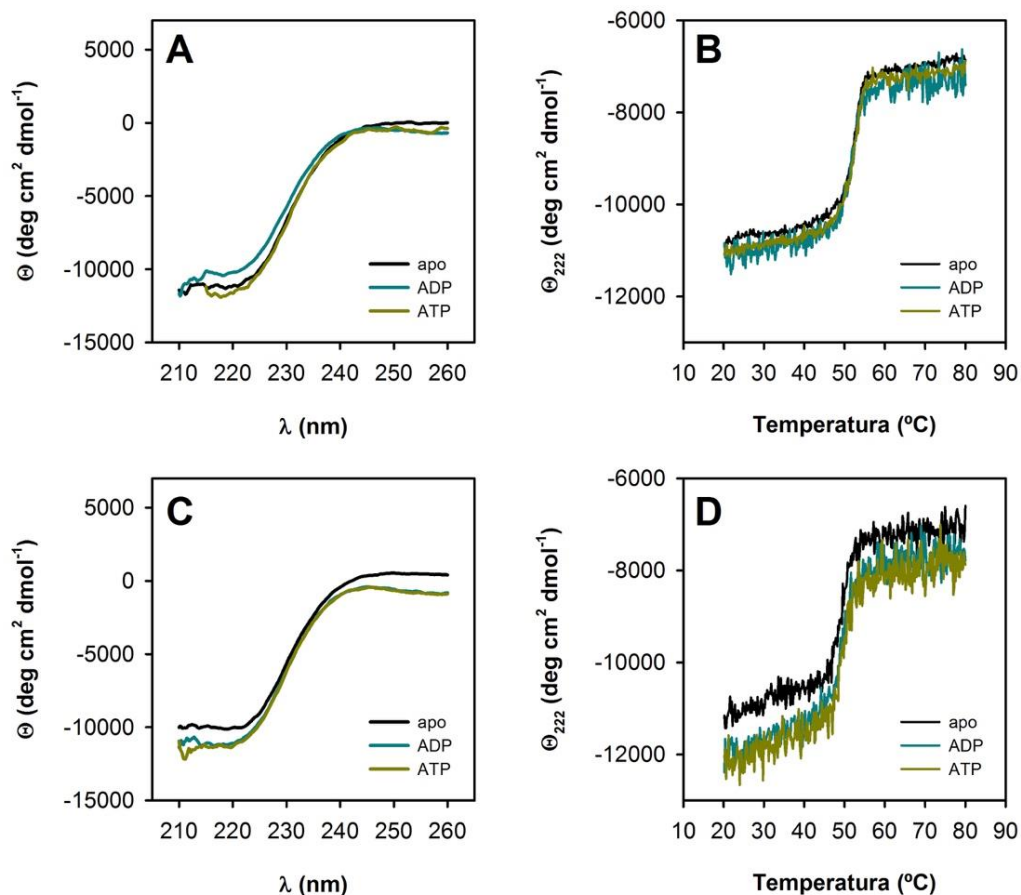


Figura 4.9: Caracterización de la estructura secundaria y desnaturalización de Apg2 y el mutante Apg2 Δ AS en ausencia o en presencia de nucleótidos. A y C, espectros de CD de Apg2 y Apg2 Δ AS obtenidos a 20 $^{\circ}$ C en ausencia de nucleótidos (línea continua) o en presencia de ADP (línea discontinua) o ATP γ S (línea punteada). B y D, desnaturalización térmica de Apg2 y Apg2 Δ AS medida monitorizando de forma continua la elipticidad a 222 nm. Los ensayos se realizaron en ausencia o presencia de nucleótidos como en A y C.

C-terminales resultantes de la digestión trípica tras los residuos K⁶⁰³ y K⁵⁷¹, respectivamente. En Sse1p, el residuo correspondiente a K⁶⁰³ de Apg2 se sitúa en la primera hélice α del SBD (Figura 4.10C), mientras que K⁵⁷¹ corresponde al extremo C-terminal del AS de Apg2. Los resultados de proteólisis parcial sugieren que la delección de este dominio reduce la accesibilidad del residuo K⁵⁷¹ situado en el SBD β de Apg2.

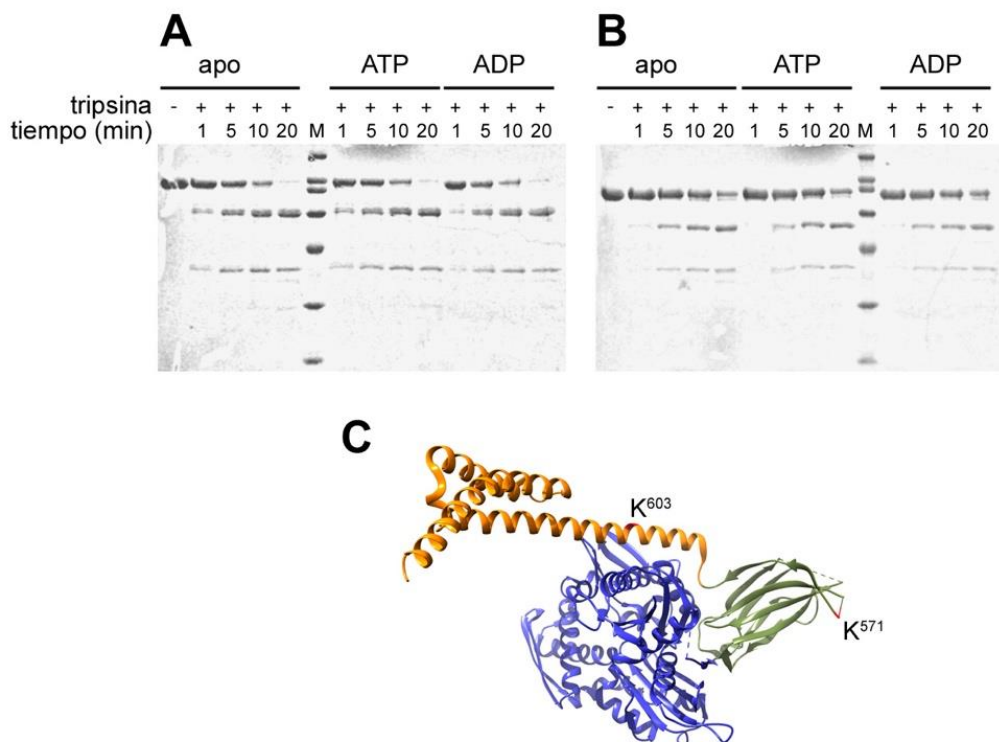


Figura 4.10: Proteólisis parcial con tripsina de Apg2 y Apg2ΔAS en ausencia o en presencia de nucleótidos. Apg2 silvestre (A) y Apg2ΔAS(B) fueron incubadas con tripsina durante los tiempos indicados. Los fragmentos proteolíticos fueron resueltos y visualizados mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. C, estructura de Sse1p (pdb 3C7N) en la que se destacan las posiciones equivalentes a los residuos K⁶⁰³ y K⁵⁷¹ de Apg2. Los dominios se han representado con el siguiente código de colores: azul, NBD; verde, SBDβ; naranja, SBDα.

4.2.2.3. Cromatografía de tamizado molecular analítica y electroforesis nativa

Finalmente, estudiamos si la delección del AS podría afectar a la estructura cuaternaria de la proteína y si la unión de nucleótidos modifica el estado oligomérico de Apg2. Para ello, se realizaron estudios de electroforesis nativa y SEC. Mediante electroforesis en condiciones nativas, observamos que Apg2 migró en el gel mayoritariamente como una única banda mostrando un peso molecular aparente mayor al teórico obtenido de la secuencia para un monómero (Figura 4.11A), un hecho que ya había sido descrito anteriormente (Oh et al. 1999). Para Apg2ΔAS se observó un gran aumento de la masa aparente en el gel nativo, que podría sugerir una oligomerización del mutante,

compatible posiblemente con la dimerización. Sin embargo, el análisis por SEC de ambas proteínas descartó este hecho ya que el mutante truncado eluyó con un tamaño muy similar a la proteína silvestre (Figura 4.11B). Es muy posible que la delección del AS, una región con muchos residuos ácidos agrupados, provoque una gran disminución de la movilidad electroforética.

Por otro lado, Apg2 silvestre y Apg2 Δ AS eluyeron en el análisis por SEC con volúmenes de elución (V_e) 8,6 y 9,1 ml, respectivamente (Figura 4.11B). El calibrado de la columna con proteínas estándar mostró que estos V_e correspondían a masas aparentes muy superiores al tamaño obtenido por la secuencia. Como se puede observar en los cromatogramas mostrados en las Figuras 4.11C y D, la adición de nucleótidos no modificó los V_e de Apg2 y Apg2 Δ AS por lo que se descarta la variación del estado oligomérico de ambas proteínas tras la unión de ATP o ADP.

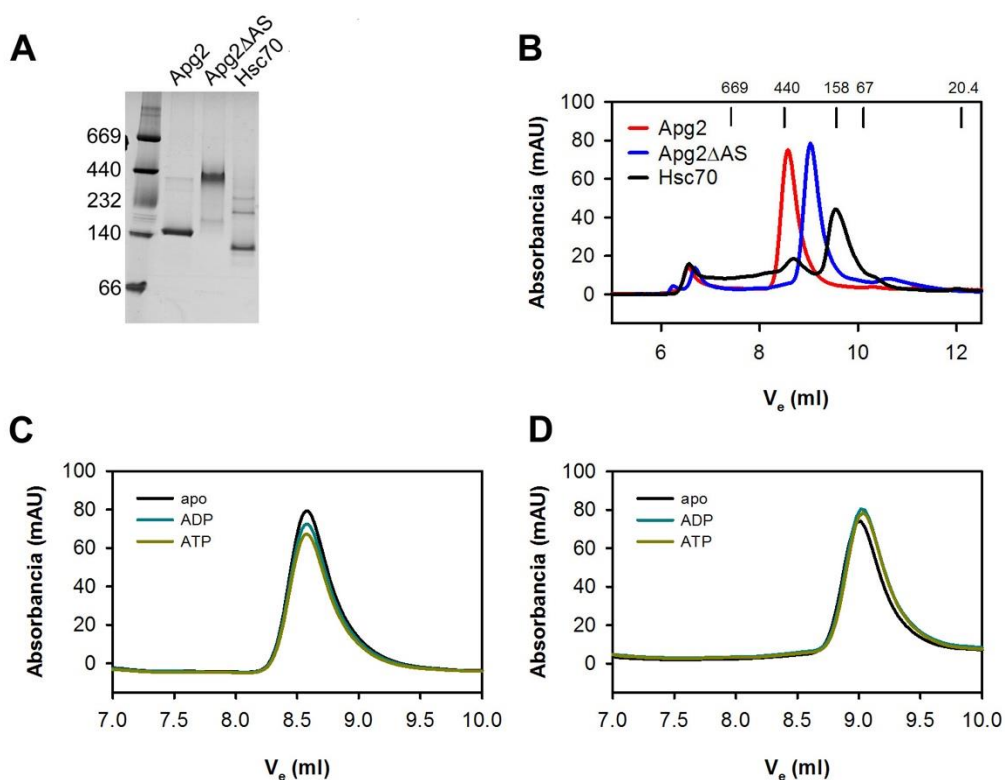


Figura 4.11: Análisis por electroforesis nativa y SEC del estado oligomérico de Apg2 y el mutante Apg2 Δ AS en ausencia o en presencia de nucleótidos. A, gel nativo teñido con azul de Coomassie de muestras de Apg2, Apg2 Δ AS y Hsc70. B, perfiles de SEC obtenidos registrando la absorbancia a 280 nm de Apg2 y Apg2 Δ AS (10 μ M). Se indica el V_e de proteínas estándar para la calibración de

pesos moleculares. C y D, perfiles SEC para las formas apo y unidas a ADP o ATP de Apg2 y Apg2ΔAS (10 μM), respectivamente.

4.2.3. Análisis de los complejos Hsc70:Apg2.

Las chaperonas Hsp70 y Hsp110 forman complejos estables con alta afinidad en presencia de nucleótidos caracterizados por constantes de disociación en el rango nanomolar, como se ha demostrado para los homólogos en levaduras Ssa1p y Sse1p (Andréasson et al. 2008; Raviol, Sadlish, et al. 2006; Shaner et al. 2006). Aquí hemos caracterizado la formación de complejos entre Hsc70 y Apg2 humanas, y el papel del dominio AS en la interacción. Para ello se han realizado ensayos de SEC, resonancia de plasmón superficial (SPR) y electroforesis en geles nativos.

4.2.3.1. Análisis por SEC de los complejos Hsc70:Apg2

La formación de complejos entre Apg2 y Hsc70 se estudió inicialmente mediante SEC. Para ello, se analizaron en una columna Bio Sec-5 muestras de Apg2 y Hsc70, a 10 y 15 μM respectivamente, incubadas durante 30 minutos en ausencia de nucleótidos (apo, Figura 4.12A), y en presencia de ADP (Figura 4.12B) o ATP (Figura 4.12C). En condiciones apo y ADP, se observó una muestra heterogénea en la que coexisten complejos de varios tamaños moleculares con las proteínas libres. Esto está posiblemente debido a la oligomerización de Hsc70 (Figura 4.12A y B, líneas verdes), una característica común de esta familia de chaperonas (Benaroudj et al. 1997; Takakuwa et al. 2019), lo que provoca la formación de complejos multiméricos cuando Apg2 se une a los diferentes oligómeros formados por Hsc70. La unión de ATP reduce considerablemente la formación de oligómeros por Hsc70 (Figura 4.12C, línea verde). De este modo, la inclusión de ATP durante la incubación de Apg2 y Hsc70 para la formación del complejo entre ambas proteínas, disminuyó la cantidad de complejos de elevado peso molecular. En estas condiciones se observó mayoritariamente un V_e de 8,3 ml, además de picos minoritarios a 7,9 y 7,4 ml (Figura 4.12C). Teniendo en cuenta los V_e de Apg2 y Hsc70 aisladas (8,6 y 9,5 ml, respectivamente), el complejo eluido a 8,3 ml puede corresponder al complejo 1:1. Cuando en el ensayo se empleó Apg2 marcada con Alexa 488 se observó que la proteína aparecía en los tres V_e descritos. Esto demuestra que Apg2 se une a los oligómeros formados por Hsc70, como se ha propuesto anteriormente. Para minimizar la formación de oligómeros de Hsc70, se realizaron ensayos a concentraciones inferiores, un factor importante en la auto asociación de estas proteínas (Aprile et al. 2013). A concentraciones menores, especialmente a 5 μM, se observó como la cantidad de oligómeros de Hsc70 se redujo significativamente

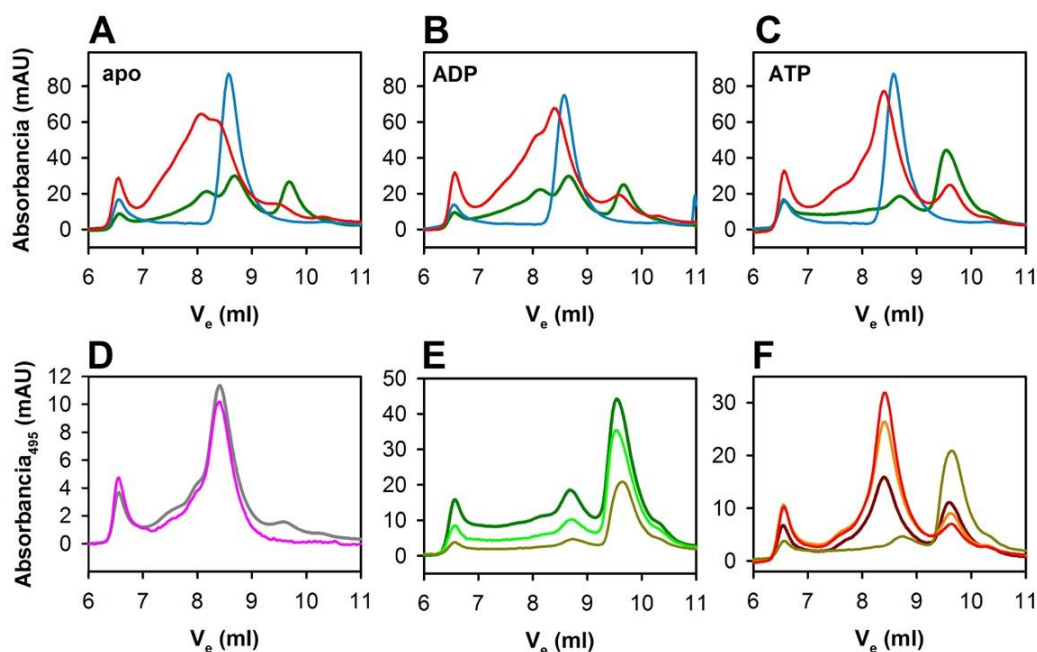


Figura 4.12: Análisis de la formación de complejos entre Apg2 y Hsc70 por SEC.

Los complejos formados por Apg2 (10 μ M) y Hsc70 (15 μ M) en ausencia de nucleótidos (A) y en presencia de ADP (B) y ATP (C) se analizaron mediante SEC. El cromatograma resultante se muestra mediante una línea roja. Como control, se muestran los cromatogramas obtenidos para Apg2 (azul) y Hsc70 (verde) aisladas. D, perfil de elución de los complejos formados por Apg2 marcada con Alexa 488, obtenido registrando la absorbancia a 497 nm (morado). E, SEC de Hsc70 a 15 (verde oscuro), 10 (verde claro) y 5 μ M (verde oliva) en presencia de ATP. F, complejos formados en presencia de ATP por Hsc70 (5 μ M) y concentraciones crecientes de Apg2, según se indica.

(Figura 4.12D). De este modo, Hsc70 (5 μ M) fue titulada con concentraciones crecientes de Apg2 obteniéndose un perfil cromatográfico muy homogéneo con un pico centrado en 8,3 ml que posiblemente corresponde al complejo 1:1 (Figura 4.12E).

4.2.3.2. Determinación de la afinidad de Apg2 por Hsc70 mediante SPR

Profundizar en el estudio de la interacción entre Apg2 y Hsc70, y el papel que juega el AS, requiere la cuantificación del equilibrio de asociación/disociación entre estas proteínas. Por tanto, se procedió a estimar las constantes de equilibrio de disociación (K_d) de los complejos formados entre Apg2 y Apg2 Δ AS con Hsc70, mediante ensayos de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR del inglés *Surface Plasmon Resonance*).

Para llevar a cabo estos experimentos, se clonó y purificó una variante de Hsc70 en la que se fusionó una etiqueta *Streptag II* al extremo C-terminal de la proteína (denominada Hsc70_{Strep}). El análisis funcional de esta proteína dio como resultado una disminución del 30-35 % aproximadamente en sus actividades ATPasa en su valor máximo y reactivadora de agregados proteicos (Figura 4.13C). A pesar de esto, Hsc70_{Strep} resultó ser un mutante valioso con el que realizar experimentos comparativos de SPR diseñados para estudiar la formación de complejos con Apg2 silvestre y Apg2 Δ AS.

En estos experimentos se emplearon sensores a los que se inmovilizó un anticuerpo monoclonal contra el *Streptag II*, con la finalidad de capturar Hsc70_{Strep}. Se inyectaron concentraciones crecientes de Apg2 o Apg2 Δ AS, y se registraron los sensogramas correspondientes. En ausencia de nucleótido, se observó una interacción fuerte caracterizada por cinéticas de asociación y disociación muy rápidas (Figura 4.13A), tal y como ocurre para las proteínas homólogas Ssa1p y Sse1p de levaduras (Raviol, Sadlish, et al. 2006). Las K_d se obtuvieron de la representación del valor máximo alcanzado de RUs frente a la concentración de Apg2 o Apg2 Δ AS inyectada (Figura 4.13B), resultando respectivamente en valores de 148 ± 5 y 54 ± 1 nM (Tabla 4.2). Sin embargo, no se observó interacción entre Hsc70_{Strep} y Apg2 o Apg2 Δ AS en presencia de ATP (no mostrado). Finalmente, en presencia de ADP, se observó un descenso de al menos dos órdenes de magnitud en la afinidad entre Hsc70_{Strep} y ambas variantes de Apg2 (Figura 13B), lo que impidió una estimación correcta de las K_d en estas condiciones. Estos datos sugieren que posiblemente el complejo entre Hsc70 y Apg2 es asimétrico respecto al nucleótido unido a ambas proteínas y que el AS juega un papel importante en la formación del complejo, reduciendo su afinidad.

Dado que Apg2 posiblemente contiene zonas desordenadas, como el propio AS y partes del segmento C-terminal (Dublang et al. 2021), es importante determinar si alguna de estas regiones puede actuar como un pseudosustrato de Hsc70, interaccionando con el sitio de unión en el SBD de la chaperona y, por tanto, contribuyendo a la afinidad. Una interacción de este tipo es plausible y ha sido descrita para la interacción entre DnaK, la Hsp70 bacteriana, y su NEF, GrpE (Brehmer et al. 2004; Moro et al. 2007). Para estudiar esta posibilidad, se realizaron medidas de SPR empleando el mutante Hsc70-V438F, que presenta una afinidad muy reducida por sustratos proteicos (ver Figura 4.18A y el apartado correspondiente). Los resultados obtenidos mostraron K_d s ligeramente superiores a las observadas anteriormente con valores de 238 y 101 μ M para Apg2 y Apg2 Δ AS respectivamente (Tabla 4.2), lo que

indica que, si existe alguna interacción con el sitio de unión de Hsc70, esta no induce un cambio de afinidad significativo y que no está modulada por el AS.

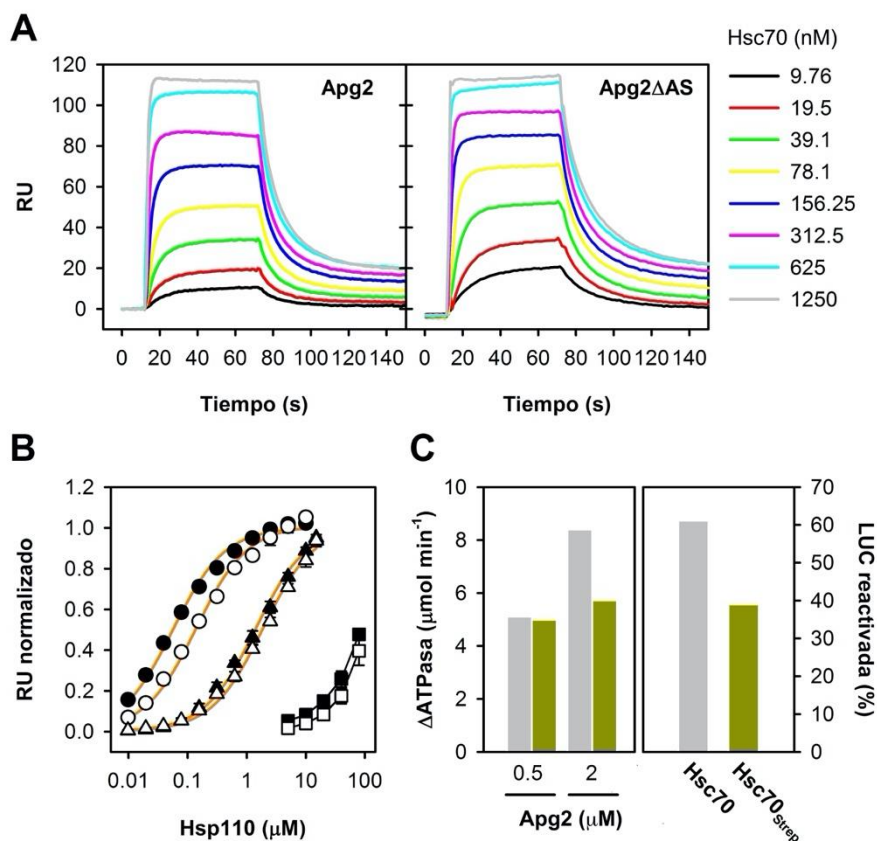


Figura 4.13: Caracterización de la K_d para la interacción de Hsc70 con Apg2 y el mutante Apg2 Δ AS. **A**, sensogramas obtenidos tras inyectar Apg2 (izquierda) o Apg2 Δ AS (derecha) a un sensor al que se había inmovilizado Hsc70_{Strep}. Las concentraciones empleadas se indican a la derecha. **B**, curvas de unión de Apg2 (símbolos blancos) y Apg2 Δ AS (símbolos negros) a Hsc70_{Strep} (círculos) o 70-NBD_{Strep} (triángulos) en ausencia de nucleótidos derivadas del análisis SPR. La interacción de Apg2 y Apg2 Δ AS con Hsc70 también se estudió en presencia de ADP purificado (cuadrados). Los valores de resonancia (RU) de tres experimentos independientes fueron normalizados con el valor máximo obtenido de las titulaciones de Apg2 y Apg2 Δ AS, y promediados. Las líneas continuas naranja representan el ajuste de los datos a un modelo de unión de sitio único. **C**, actividad ATPasa y replegadora de Hsc70 (gris) y Hsc70_{Strep} (verde).

Tabla 4.2: Constantes de equilibrio de disociación de los complejos Hsc70:Apg2. Los valores son promedio de tres experimentos independientes.

	K_d (nM)		
	Hsc70 _{Strep}	Hsc70-V438F _{Strep}	70-NBD _{Strep}
Apg2	148 ± 5	238 ± 11	1.800 ± 200
Apg2ΔAS	54 ± 1	101 ± 14	1.300 ± 200

Las estructuras 3D de los complejos Hsp70:Hsp110 resueltos hasta la fecha (Polier et al. 2008; Schuermann et al. 2008), muestran que el NBD y el SBD α de Hsp110 establecen numerosos contactos con el NBD de Hsp70, mientras que los SBD β de ambas proteínas se sitúan próximos en el espacio (Figura 1.17 de Introducción). Así, para entender mejor las interacciones que estabilizan el complejo Hsc70:Apg2, realizamos experimentos similares de SPR empleando un mutante en el que el SBD de Hsc70 fue deletado, que denominamos 70-NBD_{Strep} y que corresponde a los residuos 1 a 384 de Hsc70 seguidos del *Streptag II*. Primero, observamos una fuerte reducción de la afinidad de Apg2 silvestre por 70-NBD_{Strep}, que se refleja en un incremento de K_d de 148 a 1.800 nM (Figura 4.13B y Tabla 4.2). En segundo lugar, no se encontró el aumento de afinidad de 3 veces observado para la interacción entre Apg2ΔAS y Hsc70 con respecto a Apg2 silvestre cuando se empleó 70-NBD_{Strep}, siendo los valores de K_d 1,8 ± 0,2 y 1,3 ± 0,2 μ M para Apg2 y Apg2ΔAS, respectivamente (Tabla 4.2).

4.2.3.3.- Caracterización de los complejos Hc70:Apg2 por electroforesis nativa.

La función de Apg2 como NEF de Hsc70, que implica que debe interactuar con la forma ADP de la chaperona, y los resultados del análisis de la formación del complejo Hsc70:Apg2 mediante SPR, indican que posiblemente el complejo sea asimétrico en cuanto al nucleótido que ocupa los centros de unión de Apg2 y Hsc70. Una configuración plausible, de acuerdo con lo descrito por otros autores (Polier et al. 2008; Schuermann et al. 2008), es Apg2 unida a ATP interactuando con Hsc70 unida a ADP o en estado apo. Para generar estos complejos, Hsc70 (2 μ M) fue incubada con Apg2 o Apg2ΔAS (2 μ M) durante varias horas en presencia de cantidades pequeñas de ATP (50 μ M) a temperatura ambiente, de modo que se produzca la hidrólisis completa

del nucleótido. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles nativos (Figura 4.14). En estas condiciones y a pesar de la movilidad electroforética discrepante de las proteínas aisladas, Apg2 y Apg2 Δ AS formaron un complejo mayoritario con Hsc70 de masa molecular aparente más consistente con los valores teóricos y similar para ambas proteínas (Figura 4.14A). Además, se observaron otras bandas de mayor peso molecular que podrían corresponderse con complejos oligoméricos como se ha observado por SEC.

Con el objetivo de corroborar la diferencia de afinidad entre Apg2 y Apg2 Δ AS para formar complejo con Hsc70 en presencia de nucleótidos, se realizaron ensayos de competición en los que Hsc70 (2 μ M) se incubó con una de las dos Hsp110 a concentración constante (2 μ M), en un medio que contenía 50 μ M de ATP, y se añadieron cantidades crecientes de la otra Hsp110. Los complejos resultantes se resolvieron de nuevo mediante electroforesis nativa (Figura 4.14B). Para analizar los resultados, se cuantificaron las bandas de Apg2 o Apg2 Δ AS liberada por competición del complejo en cada caso por densitometría de los geles (Figura 4.14D). Como era esperable, al aumentar la concentración de Apg2 Δ AS se impedía la unión de Apg2 a Hsc70. Del mismo modo, cantidades crecientes de Apg2 evitaron la unión de Apg2 Δ AS a Hsc70, sin embargo, se necesitaron concentraciones mayores de la proteína silvestre para poder desplazar completamente al mutante del complejo. Estos resultados demuestran que también en presencia de nucleótidos, el mutante con el AS truncado mantiene mayor afinidad por Hsc70 que la proteína silvestre. Del mismo modo, se realizaron ensayos similares empleando 70-NBD (residuos 1-384 de Hsc70) (Figura 4.14C). Se debe mencionar que el complejo formado por ambos mutantes de delección, 70-NBD:Apg2 Δ AS, migró con un peso molecular anómalo siguiendo la tendencia mostrada por el mutante Apg2 Δ AS aislado. En el caso de la formación de complejos con 70-NBD en presencia de nucleótidos, no se observaron diferencias significativas entre las dos titulaciones (Figura 4.14D), lo que indica que la interacción con el NBD de Hsc70 no se ve afectada por el AS, como se ha observado también en ausencia de nucleótidos.

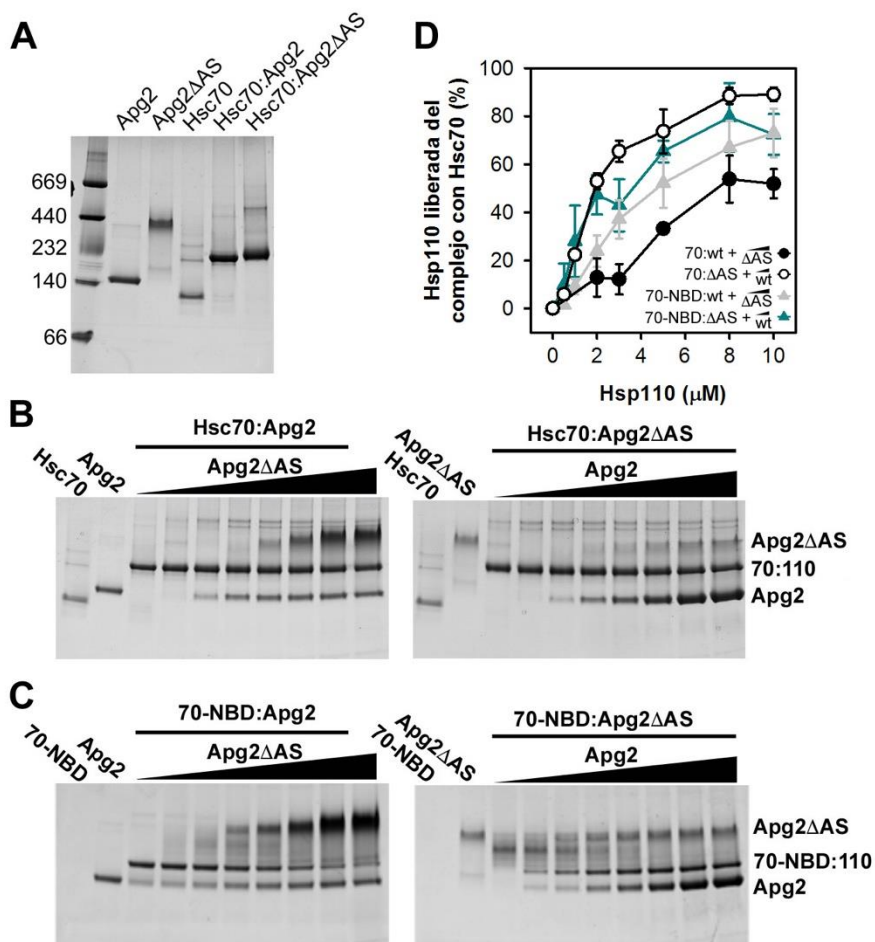


Figura 4.14: Análisis de la formación de complejos entre Hsc70 y Apg2 o Apg2ΔAS en presencia de nucleótidos. **A**, gel nativo teñido con azul de Coomassie de los complejos Hsc70:Apg2 y Hsc70:Apg2ΔAS. Como referencia se han añadido las proteínas aisladas y marcadores de pesos moleculares **B**, ensayos de competición entre Apg2 y Apg2ΔAS para la formación de complejo con Hsc70 (2 μM), según se indica. Las concentraciones crecientes de la Hsp110 con la que se compite fueron (desde la calle 3): 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 8 y 10 μM. **C**, ensayos de competición como los descritos en **B**, empleando 70-NBD. **D**, representación de la cantidad de Apg2 o Apg2ΔAS liberada del complejo con Hsc70 en función de la concentración de la Hsp110 competidora. Los diferentes ensayos se han representado siguiendo los colores indicados en la leyenda

4.2.4. Estudios funcionales del sistema de chaperonas humanas Hsc70/DnaJB1/Apg2: papel del AS de Apg2

Para entender como Apg2 regula la actividad de Hsc70 y averiguar si la delección del AS interfiere en la funcionalidad del sistema de chaperonas humano, se han llevado a cabo los siguientes ensayos funcionales:

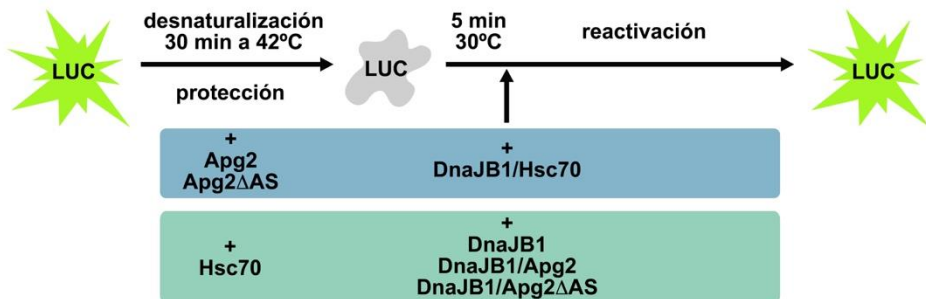
- protección de la agregación de sustratos desnaturalizados,
- replegamiento de agregados proteicos,
- interacción de las chaperonas con agregados proteicos y péptidos
- medidas ATPasa del sistema de chaperonas humano.

4.2.4.1. Protección de la agregación de sustratos proteicos desnaturalizados.

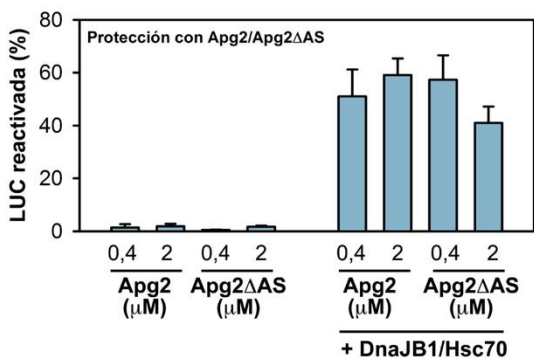
En primer lugar, se estudió la capacidad protectora de Apg2 y del mutante de delección Apg2 Δ AS, así como de Hsc70 para evitar la agregación de sustratos proteicos desnaturalizados. Para ello, se empleó Luciferasa de *Photinus pyralis* (LUC) como sustrato modelo ya que se desnaturaliza fácilmente a 42°C, una temperatura que no afecta a la estabilidad de las chaperonas. En estos experimentos LUC (0,1 μ M) se incubó a 42°C durante 30 minutos en presencia de cada una de las chaperonas mencionadas para evitar su agregación (Figura 4.15A). Cumplido el periodo de desnaturalización/protección, las muestras fueron atemperadas a 30°C durante 5 minutos para iniciar el proceso de reactivación mediante la adición de diferentes combinaciones de Hsc70 (2 μ M), DnaJB1 (1 μ M) y Apg2 o Apg2 Δ AS (a varias concentraciones, según se indique), dependiendo del tipo de experimento realizado. La cantidad de LUC renaturalizada se cuantificó midiendo la luminiscencia de alícuotas extraídas de la mezcla de reacción a diferentes tiempos y comparando el valor obtenido con un control en el que LUC se mantuvo a 30°C durante todo el ensayo.

Los ensayos de protección con Apg2 y Apg2 Δ AS se llevaron a cabo a dos concentraciones (0,4 y 2 μ M), debido a que generalmente la capacidad de protección de la agregación de LUC depende de la cantidad de chaperona empleada (Perales-Calvo et al. 2010). Tras una hora de reactivación, aproximadamente un 50% y un 60% de LUC fue recuperada por el sistema de chaperonas cuando la protección se realizó en presencia de Apg2 silvestre a 0,4 y 2 μ M, respectivamente (Figura 4.15B). En ausencia de Hsc70 y DnaJB1, la cantidad de luciferasa reactivada no superó el 2% del total a cualquiera de las concentraciones empleadas. En presencia de 0,4 μ M de Apg2 Δ AS la reactivación fue igual de eficiente, recuperándose en torno al 60% de la actividad enzimática de LUC. Sin embargo, cuando la concentración de mutante añadida fue de 2 μ M, solamente un 40% de LUC pudo ser reactivada, lo que representa

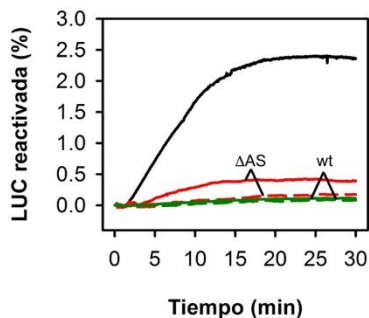
A



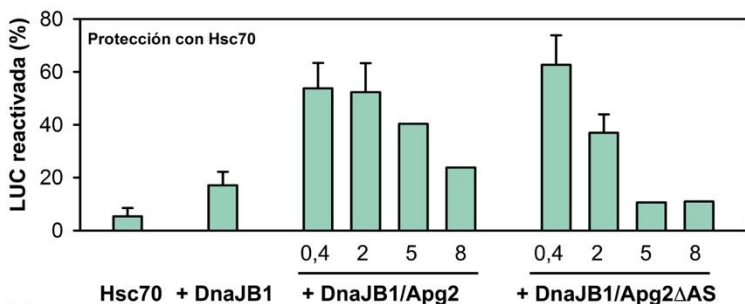
B



C



D



E

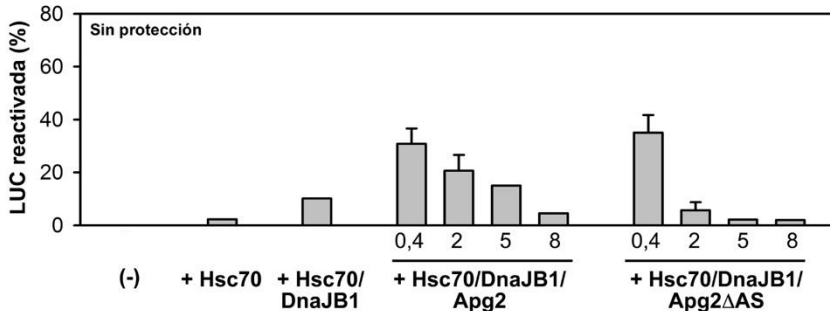


Figura 4.15 (página anterior): Protección de la agregación de luciferasa desnaturalizada térmicamente por Apg2, Apg2 Δ AS y Hsc70. **A**, representación esquemática de los ensayos de protección de LUC por Apg2, Apg2 Δ AS y Hsc70. **B**, porcentajes de LUC replegada tras 60 min de reactivación en presencia de las chaperonas humanas, tras protección con Apg2 o Apg2 Δ AS a 0,4 y 2 μ M según se indica. La concentración de DnaJB1 y Hsc70 fueron 1 y 2 μ M, respectivamente. **C**, agregación de LUC (0,1 μ M) a 42°C monitorizada por medidas de dispersión de luz a 320 nm en ausencia de chaperonas (línea negra) o en presencia de Apg2 (líneas verdes) o Apg2 Δ AS (líneas rojas) a 0,4 (líneas continuas) y 2 μ M (líneas discontinuas). **D**, reactivación de LUC protegida de la agregación por Hsc70 (2 μ M), tras 60 min de incubación en presencia de las chaperonas indicadas. La concentración de DnaJB1 fue 1 μ M. Se emplearon concentraciones crecientes de Apg2 y Apg2 Δ AS. **E**, replegamiento de LUC (0,1 μ M) agregada a 42°C durante 30 min por diferentes combinaciones de chaperonas humanas. Se emplearon concentraciones como en D.

una reducción aproximada del 30% de la capacidad protectora de la proteína. Este efecto pudo observarse también a través de las velocidades iniciales de reactivación del sustrato. La velocidad de renaturalización de LUC en presencia de Apg2 fue mayor a 2 μ M que a 0,4 μ M de chaperona (1,34 y 1,09 %min⁻¹, respectivamente). Los valores máximos de velocidad inicial de reactivación se obtuvieron para Apg2 Δ AS 0,4 μ M, disminuyendo ésta a la mitad en presencia de 2 μ M de la proteína truncada (1,68 y 0,86 %min⁻¹, respectivamente). Para demostrar que LUC no agregaba en estos ensayos, la capacidad para proteger al sustrato de estas chaperonas fue medida también a tiempo real mediante ensayos de dispersión de luz. Tal y como se observa en la Figura 4.15C, tanto Apg2 como Apg2 Δ AS fueron capaces de proteger eficientemente a este sustrato evitando su agregación de modo similar. Por lo tanto, los resultados aquí expuestos indican que Apg2 y el mutante de delección del AS pueden interactuar con la luciferasa y mantenerla en una conformación desnaturalizada, no agregada. La posterior reactivación de ésta requiere la presencia de Hsc70 y DnaJB1, es decir el sistema completo de chaperonas humanas, lo que indica que la actividad replegadora independiente de Apg2 es muy baja o inexistente. La eliminación del dominio AS afecta el replegamiento del sustrato, siendo el mutante truncado menos eficiente que la proteína silvestre a concentraciones elevadas.

Los ensayos de protección en presencia de Hsc70 se realizaron a una concentración de 2 μ M de la chaperona. La reactivación se ensayó añadiendo DnaJB1 (1 μ M) o DnaJB1

(1 μM) y Apg2 o Apg2 ΔAS a diferentes concentraciones para estudiar en más detalle su efecto. Como ocurre para Apg2, Hsc70 fue también ineficaz reactivando LUC en ausencia de sus cochaperonas, obteniéndose un 5,4% de sustrato replegado (Figura 4.15D). La adición de DnaJB1 triplicó el porcentaje de LUC reactivada, pasando a un 17 % de proteína recuperada, y aumento diez veces la velocidad inicial de dicho proceso. Cuando la reactivación de LUC se llevó a cabo en presencia del sistema completo de chaperonas, la cantidad de proteína recuperada fue tres veces mayor, llegando a alcanzar porcentajes del 54% y del 63% de LUC reactivada a 0,4 μM de Apg2 o Apg2 ΔAS , respectivamente (Figura 4.15D). Estos valores son muy similares a los observados cuando la protección se llevó a cabo con estas proteínas (Figura 4.15B). En estas condiciones, la velocidad inicial de la reacción incrementó en torno a 8 veces con respecto a la observada para el sistema Hsc70/DnaJB1 en solitario, siendo ligeramente superior en presencia de Apg2 ΔAS . El incremento progresivo de la concentración de Apg2 provocó un descenso de la cantidad de LUC reactivada, como se ha observado para otros NEF. Como se ha observado anteriormente, el efecto nocivo del aumento de la concentración de la cochaperona fue mucho más pronunciado para el caso de Apg2 ΔAS , llegando a inhibir la reactivación alcanzada por parte Hsc70/DnaJB1 en ausencia del NEF.

Finalmente, como control a los ensayos de protección de la agregación, se realizó un experimento similar en que la desnaturalización térmica de LUC (0,1 μM) se llevó en ausencia de chaperonas, de modo que se formasen agregados proteicos. Como se ha demostrado en el Apartado 1, este tipo de agregados son muy estables por lo que se obtienen porcentajes de reactivación bajos, pero significativos, cuando se emplea el sistema completo de chaperonas humanas a concentraciones óptimas. Este fue el caso como se observa en la Figura 4.15E, obteniéndose aproximadamente una reactivación de LUC del 30% para Hsc70 (2 μM), DnaJB1 (1 μM) y Apg2 o Apg2 ΔAS (0,4 μM). Además, el efecto perjudicial provocado por el incremento de la concentración de Apg2 es más pronunciado con los agregados de LUC. Esto está especialmente agravado tras la delección del dominio AS, de modo que el incremento de la concentración de Apg2 ΔAS de 0,4 a 2 μM provocó una caída drástica de casi el 90% (de 32 a 4%) en la cantidad de LUC reactivada (Tabla 4.3A). La reactivación en presencia del mutante truncado fue prácticamente indetectable a concentraciones superiores.

4.2.4.2. Replegamiento de agregados proteicos.

Con el objetivo de profundizar en el papel que juega Apg2 en la reactivación de agregados proteicos por el sistema de chaperonas humano y, en especial, como el

dominio AS regula su actividad, se realizaron ensayos con agregados formados en condiciones que permitiesen rendimientos de reactivación superiores. De acuerdo con los resultados obtenidos en el Apartado 4.1, estos agregados fueron:

- agregados de LUC (2 μM) formados tras la desnaturalización en presencia de Urea 6M a 30°C durante 30 min y posterior dilución a 40 nM (50 veces) en tampón de ensayo (Figura 4.16A);
- agregados de G6PDH (2,5 μM) formados mediante la desnaturalización térmica por incubación a 50°C durante 30 min (Figura 4.16A).

Los agregados de LUC se llevaron a una concentración final de 20 nM en presencia de diferentes combinaciones de Hsc70 (2 μM), DnaJB1 (1 μM) y Apg2 o Apg2 Δ AS (0-8 μM). La reactivación se realizó a 30 °C y se inició tras la adición de ATP y un sistema regenerador de ATP. Se llevaron a cabo medidas de luminiscencia de alícuotas obtenidas a diferentes tiempos para calcular la cantidad de LUC reactivada, que se expresó como un porcentaje de la actividad de una muestra control en la que el sustrato fue sometido al mismo tratamiento omitiendo la Urea (Figura 4.16B). La inclusión de Apg2 y Apg2 Δ AS a bajas concentraciones estimuló la reactivación del agregado de LUC, aumentando significativamente la velocidad de replegamiento llegándose a reactivar prácticamente el 100% del agregado de LUC tras 2 horas de incubación (Figura 4.16B y D). A las concentraciones óptimas de Apg2 1 μM y Apg2 Δ AS 0,4 μM , la velocidad de replegamiento se incrementó aproximadamente 6 veces, pasando de 0,22 a 1,2 % min^{-1} y a 1,35% min^{-1} para Apg2 y Apg2 Δ AS, respectivamente.

Los agregados de G6PDH fueron equilibrados durante 10 min a 30 °C y diluidos a la concentración final de 0,4 μM en presencia de las chaperonas humanas. El ensayo de reactivación se inició tras la adición del ATP al medio y se siguió durante cuatro horas, midiendo la actividad G6PDH, como se indica en Materiales y Métodos, de alícuotas de la muestra recogidas a diferentes tiempos (Figura 4.16C). Al igual que lo que ocurría con los agregados de LUC, las concentraciones subestequiométricas de Apg2 y Apg2 Δ AS estimularon la reactivación de estos agregados (Figura 4.16E), llegando a una reactivación de aproximadamente el 80% de la G6PDH agregada tras dos horas de reacción, observándose un incremento de aproximadamente 3 veces la velocidad inicial de reactivación, respecto a la observada para Hsc70/DnaJB2.

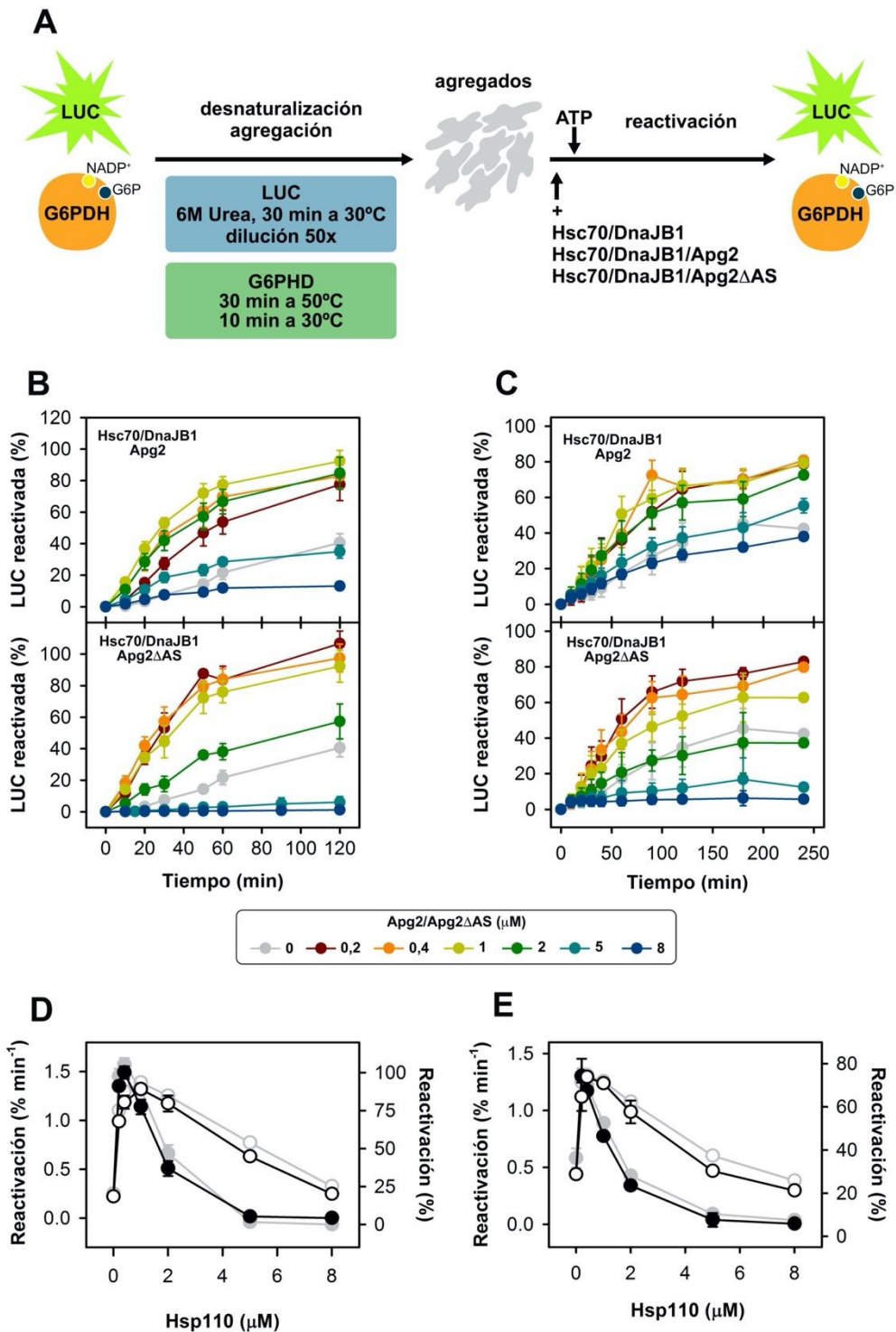


Figura 4.16 (página anterior): Reactivación de agregados de LUC y G6PDH por chaperonas humanas. **A**, representación esquemática de la formación de agregados de LUC y G6PDH y los ensayos de reactivación por diferentes combinaciones de las chaperonas humanas. **B** y **C**, cinética de reactivación de agregados de LUC (**B**) y G6PDH (**C**) por Hsc70/DnaJB1/Apg2 (paneles superiores) o Hsc70/DnaJB1/Apg2 Δ AS (paneles inferiores) a concentraciones crecientes según se indica. **D** y **E**, velocidades iniciales de replegamiento (en negro) y porcentajes de reactivación de LUC (**D**) y G6PDH (**E**) tras 120 min (en gris) por Hsc70 y DnaJB1 en presencia de Apg2 (símbolos vacíos) o Apg2 Δ AS (símbolos llenos).

El aumento de la concentración de Apg2 redujo paulatinamente la velocidad y el porcentaje de reactivación de ambos agregados, de acuerdo con resultados publicados por otros autores (Rampelt et al. 2012; Tzankov et al. 2008). Como se ha observado en el apartado anterior, el efecto negativo del aumento de la concentración de la cochaperona fue mucho más pronunciado para el mutante Apg2 Δ AS. El punto de mayor diferencia observado entre Apg2 y Apg2 Δ AS fue a 2 μ M, donde la tasa de replegamiento en presencia del mutante de delección fue similar a la obtenida por Hsc70/DnaJB1, mientras que la proteína silvestre mostraba valores de reactivación ligeramente inferiores al valor máximo para los dos sustratos. Concentraciones más altas de Apg2 y Apg2 Δ AS disminuyeron progresivamente las diferencias entre las dos proteínas, incluso llegando a inhibir la reactivación de los agregados por debajo de los valores observados para Hsc70/DnaJB1.

Los resultados obtenidos demuestran que la actividad replegadora del sistema de chaperonas Hsc70/DnaJB1/Apg2 está regulada por Apg2 y es óptima a concentraciones subestequiométricas de la cochaperona. La delección del AS estrecha el rango de concentraciones a la que la actividad replegadora es máxima, lo que posiblemente está ligado al incremento de la afinidad por Hsc70. Además, las propiedades conformacionales de los sustratos parecen ser importantes, ya que la diferencia entre Apg2 y Apg2 Δ AS en reactivar los sustratos se agranda al pasar de sustratos desplegados a agregados de estabilidad media y, finalmente, agregados muy estables.

4.2.4.3. Interacción de las chaperonas con sustratos proteicos

La reactivación de agregados proteicos requiere que las chaperonas se asocien a la superficie del agregado de modo que extraigan cadenas polipeptídicas para que puedan ser remodeladas hasta adquirir su conformación nativa. De cara a intentar

comprender mejor este proceso, se llevaron a cabo ensayos de unión de chaperonas a agregados de G6PDH y el péptido FYQLALT (FT7).

4.2.4.3.1. Interacción de las chaperonas con agregados de G6PDH

En primer lugar, se estudió la unión de cada una de las chaperonas por separado, así como la de las distintas combinaciones posibles entre ellas, a agregados de G6PDH formados mediante desnaturalización térmica por incubación a 50°C durante 30 minutos (Figura 4.17A). Se encontró que la asociación de Hsc70 era dependiente de la interacción previa de DnaJB1 con el agregado, un patrón similar al observado para su homóloga bacteriana DnaK (Acebrón et al. 2009), ya que la cantidad de Hsc70 unida al sustrato incrementó 5 veces en presencia de la cochaperona (Figura 4.17A y C). La unión de DnaJB1 al agregado fue ligeramente mayor que la de Hsc70 de forma aislada, pero no mejoró en presencia de Hsc70 y/o Apg2. Por otro lado, la cantidad de Apg2 asociada al agregado fue muy baja en comparación con Hsc70 y DnaJB1, y no varió significativamente por la unión previa de estas. Finalmente, Apg2 no afectó a la interacción de Hsc70 con los agregados, pero, notablemente, duplicó la cantidad de Hsc70 unida al sustrato en combinación con DnaJB1. Este aumento de la cantidad de Hsc70 asociada al agregado correlaciona con el efecto estimulador de la reactivación observado anteriormente. Por tanto, estos resultados indican que Apg2 interacciona con muy baja afinidad con el agregado de forma independiente de Hsc70 y DnaJB1, mientras que estas se unen de manera secuencial, de modo que la asociación previa de DnaJB1 es necesaria para reclutar Hsc70 en la superficie del agregado y Apg2 estimula significativamente la unión de la chaperona, alcanzando valores próximos a una relación estequiométrica con el sustrato (Figura 4.17C).

De cara a estudiar el efecto de la eliminación del AS en la interacción de Hsc70 y Apg2 con los agregados, se realizaron ensayos de coprecipitación a diferentes concentraciones de Apg2 o Apg2 Δ AS (Figura 4.17B). A baja concentraciones (0,4 μ M), ambas variantes de Hsp110 provocaron la estimulación de la asociación de Hsc70 al agregado, siendo la proteína salvaje ligeramente más eficaz. Así, Apg2 promovió la interacción del 40% de la Hsc70 total en el ensayo, alcanzando una relación molar Hsc70:G6PDH muy próxima al 1:1, mientras que Apg2 Δ AS consiguió aumentar la unión de Hsc70 hasta el 32% del total (Figura 4.17D y E). El incremento de la concentración de Hsp110 disminuyó progresivamente la cantidad de Hsc70 coprecipitada junto con el agregado de G6PDH. Este efecto fue más pronunciado para Apg2 Δ AS, llegando incluso a impedir casi completamente la interacción de moléculas de Hsc70 con el sustrato a concentraciones por encima de 5 μ M. Apg2 y Apg2 Δ AS se asociaron de forma similar con el agregado indicando que la eliminación del AS de Apg2 no afecta a la

interacción de esta chaperona con agregados proteicos, como se ha mostrado anteriormente para sustratos desplegados. La cantidad de Hsp110 unida fue muy inferior a la obtenida para Hsc70 y aumentó de linealmente con la concentración de la cochaperona (Figura 4.17D). De este modo, la fracción de Hsp110 unida se mantuvo constante, aproximadamente un 2% del total, a lo largo de la titulación (Figura 4.17E), incluso a concentraciones altas donde la unión de Hsc70 estaba inhibida considerablemente. Esto sugiere que la unión débil de Apg2 no se debe a la ocupación de posibles sitios de unión por Hsc70, sino que interacciona con los agregados con menor afinidad. Es importante destacar que la interacción de Hsc70 con los agregados coincide plenamente con las medidas de reactivación de los mismos obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales.

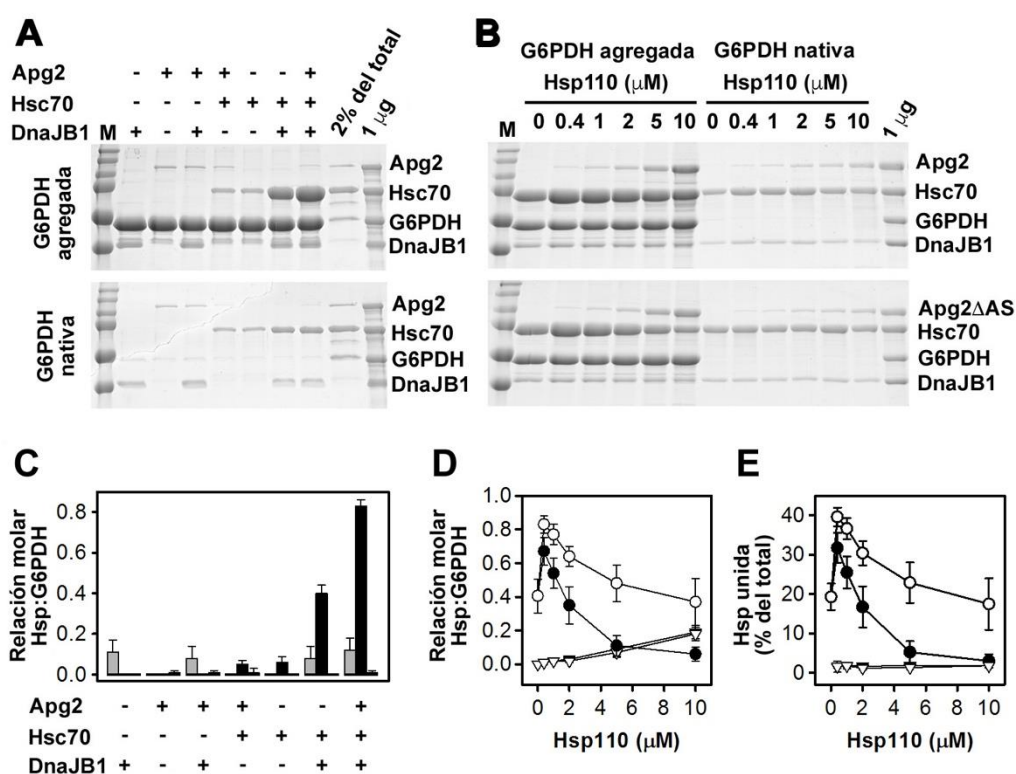


Figura 4.17: Interacción de las chaperonas humanas con agregados de G6PDH. **A**, interacción de Apg2 (0,4 μ M), Hsc70 (2 μ M) y DnaJB1 (0,5 μ M) y diferentes combinaciones de las chaperonas como se indica con agregados de G6PDH (1 μ M) (panel superior). Como control, se realizaron experimentos similares omitiendo el paso de agregación (panel inferior). Como referencia se cargaron el

2% del total de cada proteína usada en el ensayo y 1 μg de cada proteína. **B**, unión de las chaperonas humanas a G6PDH agregada o nativa a concentraciones crecientes de Apg2 (panel superior) o Apg Δ AS (panel inferior). **C**, cuantificación del gel presentado en A de DnaJB1 (barras grises), Hsc70 (barras negras) y Apg2 (barras blancas) unidas al agregado de G6PDH. Las cantidades se han expresado como una relación molar frente a la G6PDH agregada (aproximadamente el 99% del total). **D** y **E**, asociación de Hsc70 (círculos) y Hsp110 (triángulos) a los agregados de G6PDH tras la cuantificación de los geles en B. La cantidad de chaperonas unidas al agregado se han expresada como relación molar frente al sustrato (D) o % de proteína total (E), en función de la concentración de Apg2 (símbolos blancos) y Apg2 Δ AS (símbolos negros).

4.2.4.3.2. Interacción de las chaperonas con péptidos

Los resultados anteriores indican que Apg2 modifica la interacción de Hsc70 con sus sustratos, para profundizar en este aspecto se estudió la asociación y disociación del péptido FYQLALT (FT7), conocido por unirse a Hsc70 con alta afinidad (Fourie et al. 1994). Se marcó el extremo N-terminal del péptido con la sonda fluorescente 5-TAMRA para poder seguir la interacción con la chaperona por anisotropía de fluorescencia. La titulación de FT7 (0,1 μM) con las chaperonas humanas, reveló que se unía a Hsc70 con gran afinidad ($K_d = 0,44 \mu\text{M}$), mientras que no interaccionaba con Apg2 ni Apg2 Δ AS (Figura 4.18A). Por otro lado, la afinidad por FT7 se redujo drásticamente cuando se empleó el mutante Hsc70-V438F. El residuo V438 de Hsc70 se encuentra en la misma posición que V436 de DnaK, la homóloga bacteriana. Este residuo hidrofóbico se encuentra orientado hacia el sitio de unión en el SBD de DnaK y puede establecer contactos con el péptido unido. La sustitución por un residuo más voluminoso, como F, rellena el bolsillo hidrofóbico y reduce la afinidad por los sustratos de DnaK (Mayer et al. 2000). Nuestros resultados están de acuerdo con esta interpretación e implican que FT7 se une al sitio de unión ubicado en el SBD de Hsc70.

Para estudiar la asociación de FT7 a Hsc70 en presencia de Apg2 o Apg2 Δ AS, se generaron complejos estables entre ambas proteínas por incubación de una noche en presencia de ATP 50 μM , a concentraciones equimolares de ambas chaperonas. El análisis por SEC demostró que la presencia de Hsc70 libre fue insignificante a las concentraciones empleadas (Figura 4.18B). Del análisis de las cinéticas de unión de FT7 a Hsc70 libre y a cada uno de los complejos con Apg2 o Apg2 Δ AS (Figura 4.18C), se obtuvieron constantes de cinéticas observadas (K_{obs}) que se representaron frente a la concentración de Hsc70 (Figura 4.18D). Esta representación dio lugar a líneas rectas

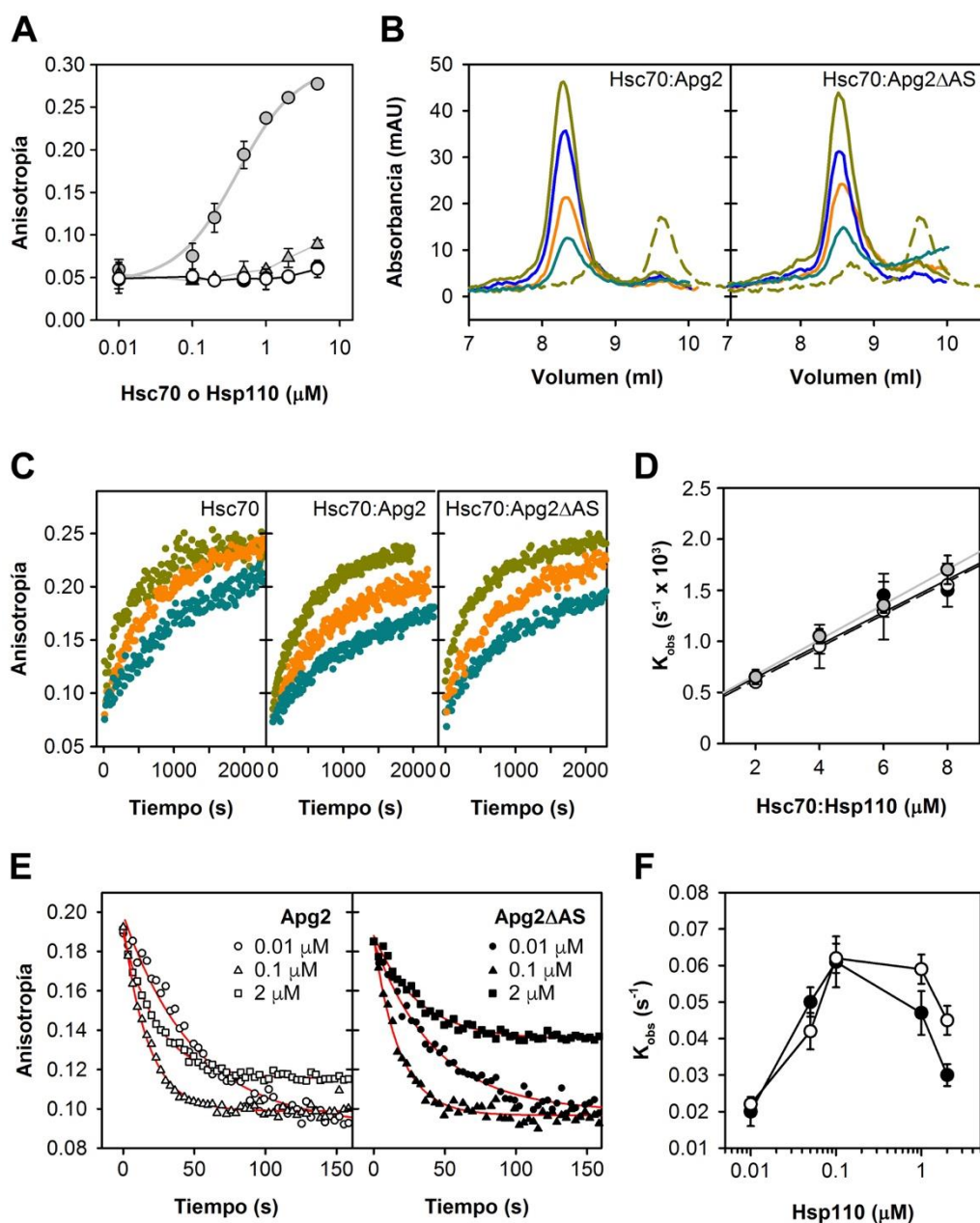


Figura 4.18: Interacción de Hsc70 con el péptido FT7 y efecto de Apg2 y Apg2 Δ AS en su asociación y disociación. **A**, unión de FT7 a Hsc70 (círculos grises), Hsc70-V438F (triángulos grises), Apg2 (círculos blancos) y Apg2 Δ AS (círculos negros). La línea continua para Hsc70 representa el mejor ajuste a un modelo cuadrático de un sitio de unión, que resulta en un valor de K_d de $0,44 \pm$

0,12 μM . **B**, purificación por SEC de los complejos Hsc70:Apg2 y Hsc70:Apg2 ΔAS a concentraciones equimolares: 2 μM (cian), 4 μM (naranja), 6 μM (azul) y 8 μM (oliva). La línea discontinua representa una muestra de Hsc70 aislada a 8 μM . **C**, cinéticas de asociación de FT7 a Hsc70 (izquierda) y los complejos Hsc70:Apg2 (centro) y Hsc70:Apg2 ΔAS (derecha) obtenidas a 2 (cian), 4 (naranja) y 8 μM (oliva). La K_{obs} de cada curva se obtuvo ajustando los datos experimentales a exponenciales simples o, para algunos casos, dobles con un componente rápido menor (<10%). **D**, determinación de las constantes k_{on} y k_{off} a partir de la representación de las K_{obs} obtenidas en B frente a la concentración de Hsc70 (círculos grises), Hsc70:Apg2 (círculos blancos) y Hsc70:Apg2 ΔAS (círculos negros). **E**, cinéticas de disociación de complejos Hsc70(ADP):FT7 preformados tras la adición de ATP 0,2 mM y Apg2 0,01, 0,1 y 2 μM (izquierda) o Apg2 ΔAS (derecha). Las líneas continuas representan los mejores ajustes para una curva de decaimiento exponencial simple. **F**, K_{off} observadas a concentraciones crecientes de Apg2 (círculos blancos) o Apg2 ΔAS (círculos negros). Los valores de K_{off} son el promedio de tres experimentos independientes.

de las que se obtuvieron las constantes cinéticas de unión (k_{on}) y disociación (k_{off}), de las pendientes y de los puntos de corte con el eje y, respectivamente (Tabla 4.3). Los resultados obtenidos demuestran que la afinidad de Hsc70 por FT7 y las constantes cinéticas que caracterizan la interacción son independientes de la presencia de Apg2, y que la delección del AS no modifica esta observación. Por lo tanto, se deduce que Apg2 no interfiere en la unión de sustratos a Hsc70. Estos resultados también apoyan que en la interacción de Apg2 y Hsc70 no existe una región de Apg2 actuando como pseudosustrato de Hsc70, que podría competir con FT7.

Seguidamente se estudió la disociación de FT7 unido a Hsc70, inducida por ATP y Apg2 o Apg2 ΔAS . Como se ha descrito anteriormente, la función mejor conocida de proteínas de la familia Hsp110 es la de promover el intercambio de ADP por ATP en Hsc70, provocando que la chaperona pase a su conformación de baja afinidad y libere los sustratos unidos al medio. Se realizaron ensayos de liberación en los que complejos formados previamente entre Hsc70 (1 μM) y FT7 (0,5 μM) en presencia de ADP, se disociaron por adición de ATP o ATP y Apg2 o Apg2 ΔAS a diferentes concentraciones (Figura 4.18E). Como el intercambio de nucleótido es limitante, se esperaba un aumento constante de la velocidad de liberación del sustrato. Por el contrario, las cinéticas de disociación mostraron un comportamiento bifásico (Figura 4.18F), en el que concentraciones por debajo de 0,1 μM de Apg2 y Apg2 ΔAS estimulaban la

liberación del péptido de forma similar, mientras que concentraciones superiores la ralentizaron, siendo este efecto mayor para el mutante de deleción. Además, la cantidad de péptido liberado en presencia de ATP y concentraciones altas de Apg2 y Apg2 Δ AS fue menor una vez alcanzado el equilibrio, evidenciado por los valores de anisotropía final más altos en los ensayos a 2 μ M (Figura 4.18E). Estos resultados sugieren que Apg2 y el mutante de deleción aceleran la unión de ATP a Hsc70 y, en consecuencia, la liberación del sustrato unido, pero inducen, además, un segundo proceso que impacta negativamente en la cinética de liberación del sustrato y muy probablemente involucra la reasociación del péptido.

Tabla 4.3: Constantes cinéticas para la unión del péptido FT7 a Hsc70 libre y en complejo con Apg2 o Apg2 Δ AS

	k_{off} ($s^{-1} \times 10^{-3}$)	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	K_d (μ M)*
Hsc70	0,32 \pm 0,04	173 \pm 11	1,8
Hsc70:Apg2	0,25 \pm 0,07	165 \pm 21	1,5
Hsc70:Apg2ΔAS	0,32 \pm 0,004	160 \pm 7	2
* Obtenida del cociente k_{off}/k_{on}			

4.2.4.4. Estudio del ciclo funcional de Hsc70 ligado a su actividad ATPasa: regulación por las cochaperonas de DnaJB1 y Apg2.

El ciclo funcional de las proteínas de la familia Hsp70 se basa en la alternancia de las conformaciones abierta, unida a ATP, y cerrada, unida a ADP (Figura 1.11) y, por tanto, depende de la unión e hidrólisis del ATP. Así, es extremadamente importante la regulación de la actividad ATPasa de Hsc70 por sus cochaperonas para la funcionalidad del sistema. Así, DnaJB1 estimula la hidrólisis del ATP, mientras que Apg2 facilita el intercambio del producto de la hidrólisis, ADP+Pi, por una nueva molécula de ATP. En este apartado se caracteriza la regulación de la actividad ATPasa del sistema de chaperonas Hsc70/DnaJB1/Apg2 bajo diferentes condiciones experimentales y se estudia el papel del AS de Apg2, empleando el mutante Apg2 Δ AS.

En primer lugar, se midió la tasa de hidrólisis de ATP, mediante un sistema acoplado que mantiene constante la concentración inicial de ATP, por diferentes combinaciones

de las chaperonas humanas a concentraciones a las que se había observado una actividad de reactivación de agregados proteicos alta (Hsc70 2 μM , DnaJB1 0,5 μM y Apg2 o Apg2 ΔAS 0,4 μM). En estas condiciones, la actividad ATPasa combinada de mezclas de Hsc70 y Apg2 o Apg2 ΔAS , que también presentan actividad ATPasa intrínseca, aumentó ligeramente y de forma similar (Figura 4.19A). Por otro lado, DnaJB1 estimuló la actividad ATPasa intrínseca de Hsc70 casi triplicando su tasa hidrolítica de 0,62 a 1,5 $\mu\text{ATP min}^{-1}$, de acuerdo con resultados publicados (Raviol, Sadlish, et al. 2006). La combinación de Apg2 y DnaJB1 activó de forma sinérgica la ATPasa del sistema completo, que aumento aproximadamente 10 veces la actividad de Hsc70 en solitario. En este ensayo inicial, no se observaron diferencias significativas entre Apg2 y Apg2 ΔAS al estimular del sistema completo de chaperonas.

Dado que el AS de Apg2 es una región de gran polaridad es probable que sea sensible a la fuerza iónica y el pH del medio de modo que estos parámetros modifiquen su interacción con Hsc70 y la regulación de la actividad chaperona. Para estudiar esta hipótesis, se realizaron medidas de la estimulación de la actividad ATPasa del sistema de chaperonas humanas a diferentes concentraciones de NaCl (de 0 a 300 mM) y pHs (de 6,5 a 8,5). En primer lugar, el incremento de la fuerza iónica del medio no afectó de manera significativa a la actividad intrínseca de Hsc70 (Figura 4.19B, panel superior), ni de Apg2 silvestre o del mutante Apg2 ΔAS (no mostrado). Sin embargo, en presencia de DnaJB1, la tasa de hidrólisis de ATP por parte de la chaperona disminuyó notablemente a medida en que se aumentó la salinidad del medio. De manera similar, la estimulación de la actividad ATPasa del sistema de chaperonas completo se redujo con el incremento de la concentración de NaCl, no observándose diferencias entre Apg2 y Apg2 ΔAS (Figura 4.19B, panel inferior). Se debe destacar que, a la concentración de NaCl mas alta ensayada, no se observó prácticamente ninguna variación de la actividad con respecto a la de las proteínas aisladas. Estos resultados indican que, posiblemente, la interacción entre las distintas chaperonas tenga un componente electrostático importante y, por lo tanto, la formación de los complejos activos se vea dificultada bajo condiciones de gran fuerza iónica. En cuanto al pH, al igual que con la fuerza iónica, no se observó una variación de la actividad ATPasa intrínseca de Hsc70, Apg2 y Apg2 ΔAS , sin embargo, la activación en presencia de DnaJB1 o del sistema completo se vio progresivamente inhibida cuanto más básico era el medio de ensayo. (Figura 4.19C). Puesto que DnaJB1 es una proteína básica (pI teórico de 8,74), puede ser que la modificación de la superficie electrostática de la misma debido al incremento del pH del medio, inhiba su interacción con Hsc70 y por lo tanto, la estimulación de su actividad ATPasa. Estos resultados demuestran que ni

la fuerza iónica ni el pH modifican el papel regulador de la actividad del sistema de chaperonas humano por el AS de Apg2.

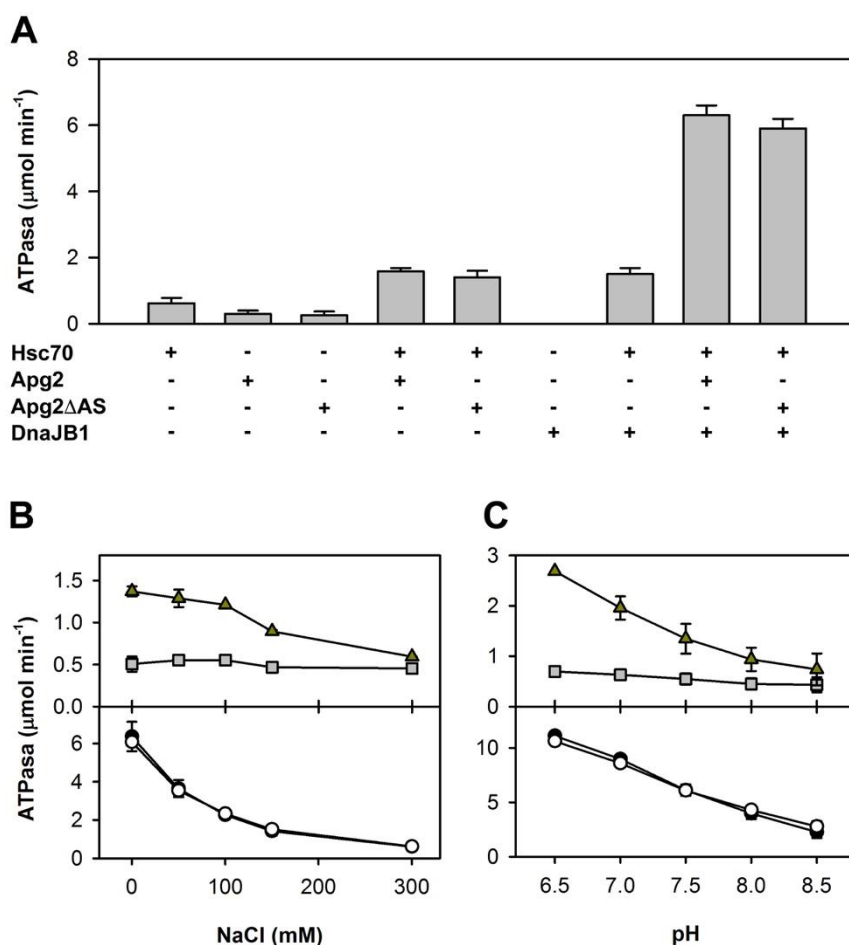


Figura 4.19: Actividad ATPasa de diferentes combinaciones de chaperonas humanas y efecto de la fuerza iónica y pH. **A**, actividad ATPasa en μmol de ATP hidrolizado por minuto por diferentes combinaciones de Hsc70 ($2 \mu\text{M}$), DnaJB1 ($0,5 \mu\text{M}$) y Apg2 o Apg2 Δ AS ($0,4 \mu\text{M}$), según se indica. **B** y **C**, efecto de la concentración de NaCl y pH en la actividad de Hsc70 (cuadrados grises), Hsc70/DnaJB1 (triángulos oliva), Hsc70/DnaJB1/Apg2 (círculos blancos) y Hsc70/DnaJB1/Apg2 Δ AS (círculos negros). Las chaperonas se emplearon a las mismas concentraciones que en A.

Como que en los apartados anteriores se han observado efectos inhibitorios de la funcionalidad del sistema Hsc70/DnaJB1/Apg2, especialmente marcados para el mutante de delección del AS, se ha estudiado la dependencia de la actividad ATPasa del sistema de chaperonas con la concentración de Apg2 y Apg2 Δ AS. Asimismo, se han realizado medidas a concentraciones crecientes de DnaJB1. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

4.2.4.4.1.- Dependencia de la actividad ATPasa con la concentración de Apg2: efecto del AS.

Al actuar como NEF, Apg2 incrementa la actividad ATPasa de Hsc70 acelerando el intercambio de ADP por ATP de modo que un nuevo ciclo de hidrólisis puede comenzar. Otros NEFs, como el homólogo de levaduras Sse1p, o proteínas no relacionadas como Bag1 humana, Fes1p de levadura y GrpE de bacterias muestran una dependencia hiperbólica de la actividad NEF con la concentración de proteína (Dragovic et al. 2006; Packschies et al. 1997; Rauch y Gestwicki 2014). Se llevaron a cabo medidas de intercambio de MABA-ADP unido a Hsc70 por ADP en un equipo de flujo detenido a concentraciones crecientes de Apg2 y Apg2 Δ AS (Figura 4.20A). La representación de las constantes de disociación observadas frente a la concentración de Apg2 muestra una dependencia hiperbólica (Figura 4.20B), de acuerdo a lo observado para otros NEFs. En estas condiciones, no se observa un efecto de la afinidad diferencial por Hsc70 y Apg2 Δ AS se comporta igual que Apg2 silvestre (Figura 4.20B). Esto indica que el AS no juega un papel determinante en la actividad NEF de la proteína, de acuerdo con resultados descritos para un mutante de delección similar de Sse1p (Polier et al. 2008).

Seguidamente se realizaron medidas de la actividad ATPasa de mezclas de Hsc70 y Apg2 o Apg2 Δ AS a concentraciones crecientes, en ausencia o presencia de DnaJB1. En ausencia de DnaJB1, Apg2 y Apg2 Δ AS promovieron un incremento de la actividad ATPasa aparentemente cercano a la linealidad, siendo éste inferior para el mutante de delección (Figura 4.21A). En presencia de DnaJB1, Apg2 indujo inicialmente un incremento hiperbólico de la hidrólisis de ATP, seguido de una fase lineal a concentraciones altas (Figura 4.21B). Sin embargo, mientras que por debajo de 0,3-0,5 μ M, Apg2 Δ AS estimuló la actividad del sistema completo de forma similar a la proteína silvestre, al elevar la concentración se observó primero una inhibición de la ATPasa a concentraciones intermedias, seguido de un leve incremento lineal a las concentraciones más altas, similar al observado para la proteína silvestre (Figura 4.21B).

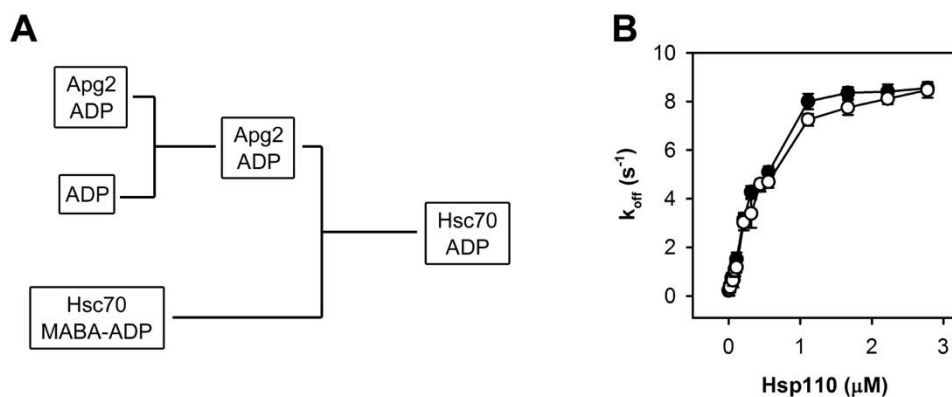


Figura 4.20: Actividad NEF de Apg2 y Apg2ΔAS. **A**, representación esquemática de los ensayos de intercambio de nucleótido. Se registró el descenso de la intensidad de fluorescencia del MABA-ADP al ser liberado de Hsc70. **B**, constantes de disociación del MABA-ADP unido a Hsc70 a concentraciones crecientes de Apg2 (círculos blancos) y Apg2ΔAS (círculos negros).

Hsc70 y Apg2 o, en su caso, Apg2ΔAS tienen capacidad de hidrolizar ATP y, por tanto, es fundamental determinar de qué chaperona procede la estimulación de la actividad ATPasa encontrada, para entender mejor los perfiles complejos observados en las titulaciones de Apg2 y, especialmente, del mutante Apg2ΔAS. Con este fin, se realizaron ensayos similares a los descritos anteriormente con los mutantes puntuales Apg2-D7S y Hsc70-T204A. Estas mutaciones se localizan en el centro catalítico y, como han demostrado otros autores, permiten la unión de ATP, pero eliminan o reducen mucho la actividad hidrolítica (Jiang et al. 2007; Rampelt et al. 2012). En primer lugar, observamos que Apg2-D7S era capaz de activar al sistema de chaperonas de forma muy similar a la observada con la proteína silvestre (Figura 4.21C). Segundo, no se observó la estimulación de la actividad ATPasa del sistema completo de chaperonas cuando se usó el mutante Hsc70-T204A (Figura 4.21D). En este caso, la tasa de hidrólisis fue ligeramente superior a la actividad intrínseca observada para Apg2.

Para completar el estudio funcional de los mutantes Apg2-D7S y Hsc70-T204A, analizamos también la reactivación de agregados de LUC formados tras la desnaturalización en presencia de urea 6M y posterior dilución del agente caotrópico (ver Figura 4.16A). La cantidad de LUC renaturalizada por el sistema de chaperonas Hsc70/DnaJB1/Apg2 fue la misma independientemente de si se empleó Apg2 silvestre

o Apg2-D7S (Figura 22A). Sin embargo, no fue capaz de reactivar el sustrato agregado bajo ninguna de las condiciones ensayadas en presencia de Hsc70-T204A (Figura 4.22B).

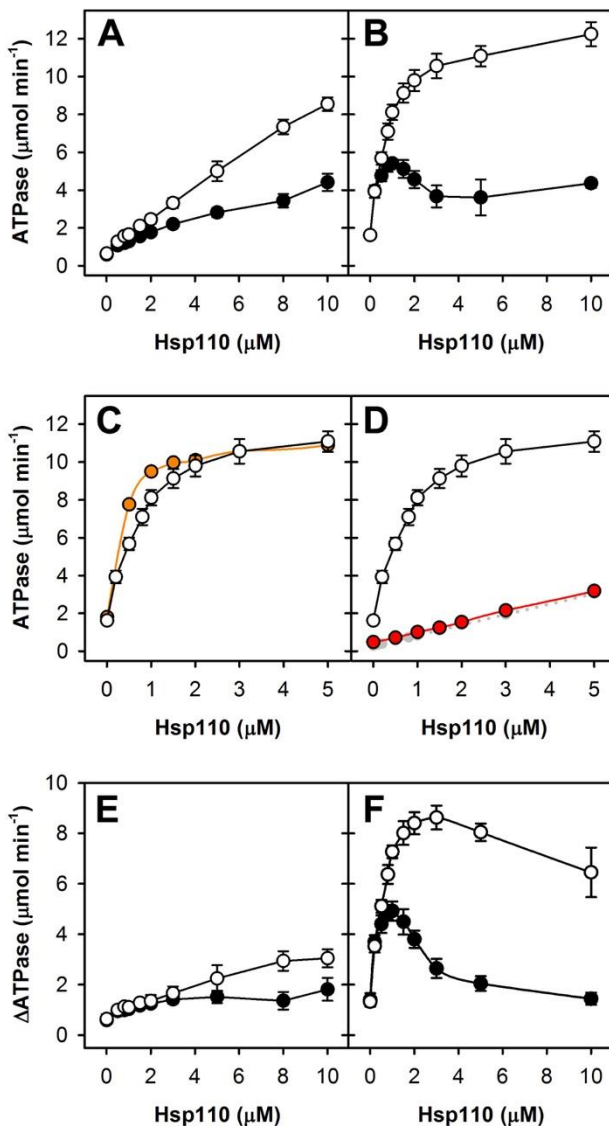


Figura 4.21: Actividad ATPasa del sistema de chaperonas humano a concentraciones crecientes de Apg2 y Apg2 Δ AS. A y B, actividad ATPasa de mezclas de Hsc70 (2 μM) y concentraciones crecientes de Apg2 (círculos blancos) o Apg2 Δ AS (círculos negros), en ausencia (A) y presencia de DnaJB1 (0,5 μM) (B). C, estimulación de la tasa de hidrólisis de ATP por Hsc70 (2 μM), DnaJB1 (0,5 μM)

por concentraciones crecientes de Apg2 (círculos blancos) y Apg2-D7S (círculos naranjas). **D**, actividad ATPasa de Hsc70-T204A (2 μ M) en presencia de DnaJB1 (0,5 μ M) y Apg2 a concentraciones crecientes (círculos rojos). Como referencia se muestran la tasa de hidrólisis de Apg2 en solitario (círculos grises) y del sistema completo con Hsc70 silvestre (círculos blancos). **E** y **F**, valores de Δ ATPasa obtenidos de restar la actividad intrínseca de Apg2 y Apg2 Δ AS a las curvas mostradas en A y B.

Los resultados obtenidos con el mutante Apg2-D7S demuestran que la actividad ATPasa intrínseca de Apg2 no es necesaria para estimular al sistema de chaperonas humano, ni para promover la reactivación de los agregados proteicos, tal y como también se ha sugerido para la proteína homóloga en levaduras Sse1 (Rampelt et al. 2012; Raviol, Sadlish, et al. 2006; Shaner et al. 2005). Por otro lado, las observaciones realizadas con Hsc70-T204A indican que el aumento de actividad observado para el sistema Hsc70/DnaJB1/Apg2 en función de la concentración de Apg2 se debe a una estimulación de la actividad de Hsc70 por sus cochaperonas y que la actividad ATPasa de Hsc70 es imprescindible para la reactivación de sustratos agregados. Teniendo en cuenta estas conclusiones, se obtuvo el valor de Δ ATPasa (Figura 4.21E y F), restando del valor experimental para la mezcla de chaperonas, la tasa de hidrólisis debida a la

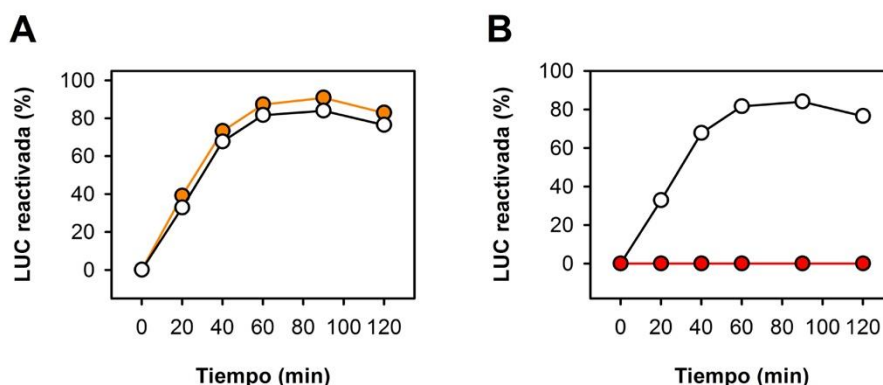


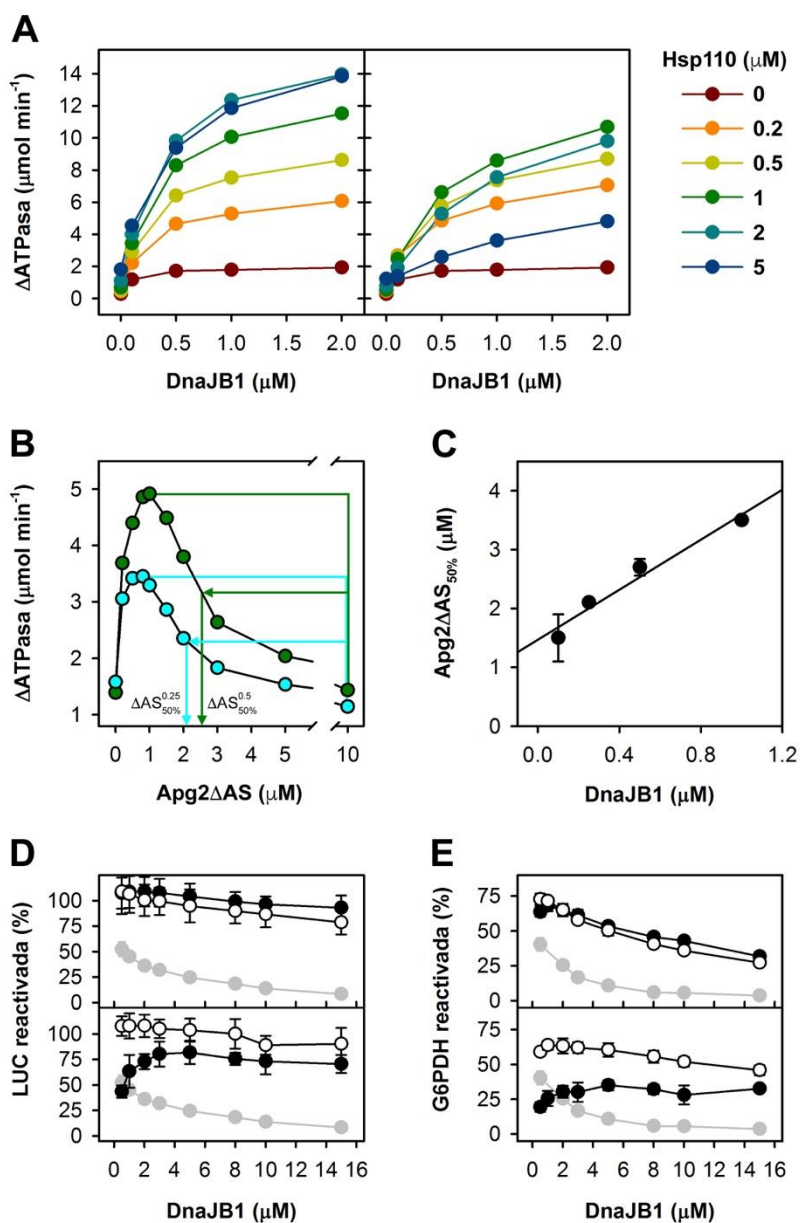
Figura 4.22: Efecto de los mutantes Apg2-D7S y Hsc70-T204A en la reactivación de agregados de LUC por las chaperonas humanas. A, cinética de reactivación de agregados de LUC por Hsc70/DnaJB1 en presencia de Apg2 (círculos blancos) o Apg2-D7S (círculos naranjas). **B**, cinética de reactivación de agregados de LUC por Hsc70/DnaJB1/Apg2 (círculos blancos) y Hsc70-T204A/DnaJB1/Apg2 (círculos rojos)).

actividad intrínseca de Apg2 o Apg2 Δ AS, la cual aumentó linealmente con la concentración de cada una de ellas. Este valor refleja con mayor fidelidad la estimulación por las cochaperonas del ciclo de hidrólisis de ATP de Hsc70 y, por tanto, de su ciclo conformacional. Los resultados obtenidos mostraron que tanto Apg2 como Apg2 Δ AS presentaron dos componentes al estimular la actividad de Hsc70 en presencia de DnaJB1: mientras que concentraciones bajas produjeron el efecto estimulador esperado, a cantidades altas indujeron una inhibición de la actividad hidrolítica (Figura 4.21F). La diferencia entre estas dos proteínas radicó en que el componente inhibitorio se apreció mucho antes para el mutante de delección del AS (a partir de aproximadamente 0,3 μ M frente a 3 μ M para la proteína salvaje), lo que está en consonancia con la mayor afinidad observada de Apg2 Δ AS por Hsc70. Además, el efecto inhibitorio fue más pronunciado para Apg2 Δ AS, alcanzándose al final de la titulación valores de actividad similares a los observados para Hsc70/DnaJB1 en solitario. En ausencia de DnaJB1, el efecto inhibitorio se observó en menor medida solo para Apg2 Δ AS (Figura 4.21E). Nuestros resultados concuerdan con lo observado para el homólogo humano Hsp105 (Tzankov et al. 2008; Yamagishi et al. 2004).

4.2.4.4.2.- Regulación por DnaJB1.

Para completar el estudio de la regulación del ciclo ATPasa de Hsc70 por sus cochaperonas, se realizaron medidas de la actividad ATPasa del sistema completo de chaperonas a diferentes concentraciones de DnaJB1 (de 0 a 5 μ M) y varias concentraciones de Apg2 y Apg2 Δ AS (Figura 4.23A).

Figura 4.23 (página siguiente): Regulación de la actividad ATPasa del sistema de chaperonas humano por DnaJB1. **A**, Δ ATPasa de mezclas de Hsc70 (2 μ M) y concentraciones crecientes de DnaJB1 a diferentes concentraciones de Apg2 (panel izquierdo) y Apg2 Δ AS (panel derecho), según se indica por el código de color. **B**, determinación del parámetro Apg2 Δ AS_{50%} para las titulaciones realizadas a 0,25 y 0,5 μ M DnaJB1 (cian y verde, respectivamente). **C**, representación de Apg2 Δ AS_{50%} frente a la concentración de DnaJB1. **D** y **E**, reactivación de agregados de LUC (D) y G6PDH (E) por Hsc70 (2 μ M), Apg2 (círculos blancos) o Apg2 Δ AS (círculos negros) a 0,4 y 2 μ M, panel superior e inferior respectivamente, y concentraciones crecientes de DnaJB1. Los círculos grises representan la reactivación obtenida para Hsc70/DnaJB1.



Al aumentar la concentración de DnaJB1 observamos una estimulación hiperbólica de la actividad ATPasa de Hsc70, como se esperaba, alcanzando la saturación entre 1-1,5 μM para cualquiera de las concentraciones de Apg2 o Apg2ΔAS ensayadas. En presencia de Apg2 silvestre, se obtuvo el mismo valor máximo de actividad ATPasa a partir de 2 μM de proteína, mientras que con Apg2ΔAS, éste disminuyó considerablemente a concentraciones superiores a 1 μM , poniendo de manifiesto una

vez más el fuerte efecto inhibitorio que este mutante ejerce sobre el ciclo ATPasa de Hsc70.

Para comprender mejor la regulación del ciclo ATPasa de Hsc70 por las dos cochaperonas, definimos el parámetro $Apg2\Delta AS_{50\%}$, que se refiere a la concentración del mutante truncado que se necesita para reducir el valor de $\Delta ATPasa$ en un 50%, para las titulaciones a diferentes concentraciones de DnaJB1 (Figura 4.23B). Este parámetro solo pudo obtenerse para $Apg2\Delta AS$ que a concentraciones altas produjo una inhibición casi completa de la actividad del sistema ternario de chaperonas, llegando a valores similares a los obtenidos por Hsc70/DnaJB1. La representación de $Apg2\Delta AS_{50\%}$ frente a la concentración de DnaJB1 mostró una dependencia lineal (Figura 4.23C), es decir, cuanto mayor era la cantidad de DnaJB1, mayor era la concentración de Apg2 necesaria para obtener el mismo efecto inhibitorio. Por tanto, ambas cochaperonas ejercen un efecto complementario en la regulación del ciclo ATPasa de Hsc70, y DnaJB1 puede contrarrestar la inhibición provocada por las concentraciones altas de Apg2 y, en especial, $Apg2\Delta AS$. Este hecho también fue probado mediante medidas de reactivación de agregados de LUC y G6PDH (Figura 4.23D y F). Los ensayos se realizaron a dos concentraciones de Apg2 y $Apg2\Delta AS$: 0,4 μ M, donde ambas proteínas se comportan de manera similar, y 2 μ M, una concentración inhibitoria para la proteína truncada. Como ocurre en el sistema de chaperonas bacteriano (Celaya et al. 2016; Laufen et al. 1999), el incremento de la concentración de DnaJB1 reduce la capacidad de Hsc70 para replegar agregados de LUC y, en especial, de G6PDH en presencia de Apg2 a 0,4 μ M y 2 μ M (Figura 4.23D y F). Para $Apg2\Delta AS$, se encontró un resultado similar a 0,4 μ M, mientras que la inhibición provocada por el mutante a 2 μ M fue parcialmente compensada por DnaJB1 de manera gradual hasta 5 μ M. Es interesante también destacar que la inhibición de la reactivación de agregados por concentraciones altas de DnaJB1 fue mucho más prominente en ausencia de Apg2, lo que pone en evidencia el efecto compensatorio de ambas cochaperonas en la actividad del sistema.

De todos estos resultados se concluye que la actividad ATPasa y reactivadora del sistema de chaperonas humano depende del balance correcto entre las concentraciones de Apg2 y DnaJB1. Cualquier modificación fuera del rango de concentraciones óptimas resulta en la inhibición de ambas actividades, como se observa a altas concentraciones de Apg2, que posiblemente perjudica el ritmo del ciclo ATPasa y conformacional de Hsc70. Los datos también sugieren la existencia de una posible competición entre DnaJB1 y Apg2 por unirse a Hsc70.

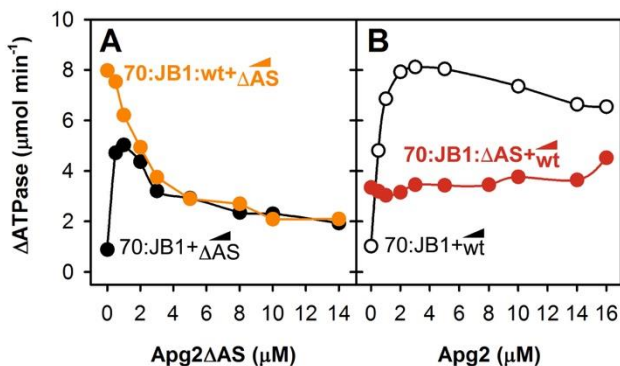


Figura 4.24: Regulación competitiva de la actividad ATPasa del sistema de chaperonas humano por Apg2 y Apg2ΔAS. **A,** ΔATPasa de mezclas de Hsc70 (2 μM), DnaJB1 (0,5 μM) y Apg2 (3 μM) medida a concentraciones crecientes de Apg2ΔAS (círculos naranjas). Como referencia, se muestra la curva obtenida en ausencia de Apg2 (círculos negros). **B,** ΔATPasa de mezclas de Hsc70 (2 μM), DnaJB1 (0,5 μM) y Apg2ΔAS (3 μM) medida a concentraciones crecientes de Apg2 (círculos rojos). Como referencia, se muestra la curva obtenida en ausencia de Apg2ΔAS (círculos blancos).

4.2.4.4.3.- Regulación competitiva del ciclo ATPasa de Hsc70 por Apg2 y Apg2ΔAS.

En el apartado 4.2.3, hemos demostrado que la forma apo de Apg2ΔAS tiene mayor afinidad para formar complejos con Hsc70 y que es capaz de competir eficazmente con Apg2 para unirse a la chaperona una vez alcanzado el equilibrio en presencia de nucleótidos. Con el fin de averiguar si estas diferencias de afinidad por Hsc70 se mantienen cuando el sistema de chaperonas es funcional, se realizaron dos ensayos de actividad ATPasa en los que, primero, la mezcla de Hsc70 (2 μM)/DnaJB1 (0,5 μM)/Apg2 (3 μM) fue titulada con concentraciones crecientes de Apg2ΔAS, y, segundo, la combinación Hsc70 (2 μM)/DnaJB1 (0.5 μM)/Apg2ΔAS (3 μM) se tituló con Apg2. Se empleó la concentración de 3 μM para Apg2 y Apg2ΔAS ya que a esa concentración la activación observada del sistema por Apg2 fue máxima, mientras que resultó fuertemente inhibitoria para Apg2ΔAS (ver Figura 4.21F), de modo que pueda observarse claramente la competencia entre ambas proteínas. Los resultados obtenidos mostraron que, primero, la estimulación de Hsc70 por Apg2 fue rápidamente eliminada por el mutante Apg2ΔAS (Figura 4.24A). Cuando ambas cochaperonas coexistían a 3 μM, la actividad observada fue muy similar a la obtenida en la titulación de Hsc70 y DnaJB1 con Apg2ΔAS. Segundo, Apg2 apenas fue capaz de compensar la inhibición de la actividad ATPasa del sistema impuesta por Apg2ΔAS

(Figura 4.24B), y solo se observó un leve incremento de dicha actividad a concentraciones de Apg2 a partir de 10 μ M. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la diferencia de afinidad entre Apg2 y Apg2 Δ AS por Hsc70 se mantiene en condiciones en las que el sistema de chaperonas es funcional.

4.3. PAPEL DE LA EXTENSIÓN C-TERMINAL DE APG2 EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA DE CHAPERONAS HUMANO.

La segunda divergencia estructural importante entre las proteínas de la familia Hsp110 y Hsp70 de origen humano se encuentra localizada en el SBD α y consiste en una extensión de aproximadamente 200 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína (Figura 4.25A). Es importante mencionar que este segmento de la proteína también distingue entre las Hsp110 de origen animal, como las humanas, y las que provienen de otros organismos, como las levaduras, en las que este segmento es más corto (Figura 4.25 B). Así, la extensión C-terminal de Sse1p de *Sacchomyces cerevisiae* solo contiene unos 50 residuos más que la secuencia de Hsp70 de levaduras o humana. Por el momento, no se entiende completamente el papel de la extensión del C-terminal tanto para Sse1 como para las Hsp110 humanas. Un mutante de Sse1p que carece de los últimos 44 residuos es funcional *in vivo*, logrando complementar completamente un fenotipo termosensible derivado de una mutación en Sse1 (Shaner et al. 2004). Sin embargo, el mismo mutante no interacciona de forma estable con Ssa1, un representante de la familia Hsp70 en levaduras, ni estimula el intercambio de nucleótido *in vitro* (Dragovic et al. 2006). Estos trabajos presentan una discrepancia no resuelta ya que tanto la actividad NEF como la formación de complejos con Ssa1 son actividades necesarias para complementar *in vivo* la termosensibilidad característica de la mutación del gen de Sse1, así como los efectos letales de la doble mutación de los genes Sse1 y Sse2 (Polier et al. 2008). Por otro lado, el segmento C-terminal de Hsp105 β de ratón suprime la señal NES de la proteína, posiblemente mediante interacciones intramoleculares, por lo que mutantes de delección de este segmento alteran su localización nuclear (Saito et al. 2009).

Para estudiar el papel que tiene la extensión C-terminal en la regulación de la actividad chaperona de Hsc70, se ha empleado un mutante de Apg2, denominado Apg2 Δ C, en el que se han eliminado los residuos 701-840. La secuencia eliminada tiene un carácter hidrofílico, rica en residuos cargados ácidos y esta conservada entre las Hsp110 humanas, especialmente en su primera mitad (Figura 4.25B). La predicción de estructura secundaria mediante el servidor Jpred 4 (Drozdetskiy et al. 2015) determina que la primera mitad de la extensión C-terminal podría adoptar una estructura helicoidal, mientras que el resto estaría desordenado (Figura 4.25). De acuerdo con esto, el alineamiento de secuencias muestra homología de la primera parte del C-terminal de Apg2 con las hélices α C, α D y α E de HspA1A (Figura 4.25A), que, junto con α B, forman un ovillo helicoidal en el SBD α (Zhang et al. 2014). Así, la extensión C-

terminal de Apg2 podría plantearse, en parte, como una ampliación del ovillo helicoidal del SBD α de la proteína. En este apartado estudiaremos las propiedades conformacionales de Apg2 Δ C, la formación de complejos con Hsc70 y la funcionalidad de sistema de Hsc70 en presencia de este mutante de eliminación.

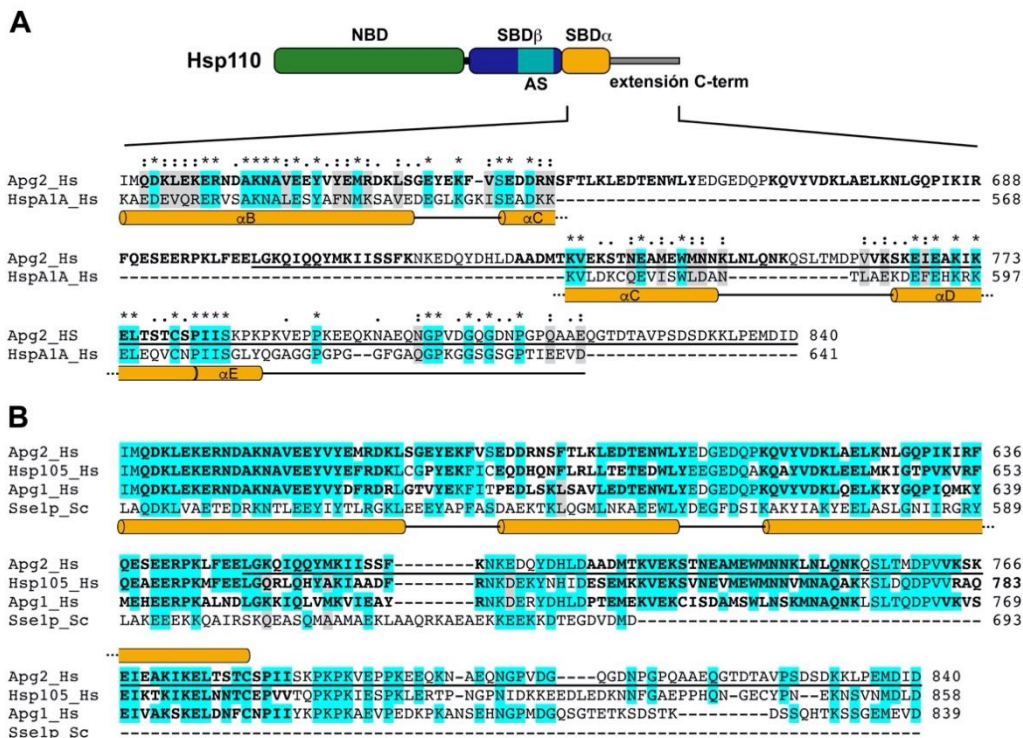


Figura 4.25: La extensión C-terminal de Hsp110 humanas. **A**, representación esquemática de la estructura de Apg2 y alineación de secuencias del C-terminal de Apg2 y HspA1A humanas. Los residuos idénticos y similares se destacan en cian y gris, respectivamente. **B**, alineamiento de los representantes de la familia Hsp110 en humanos, Apg2, Hsp105 α y Apg1, y el homólogo de la levadura *Saccaromyces cerevisiae*, Sse1p. Para A y B, los residuos subrayados corresponden a la secuencia eliminada en Apg2 (este trabajo). Las hélices α pertenecientes al SBD α de HspA1A y Sse1p se muestran mediante cilindros naranja. Las hélices α predichas mediante Jpred 4 para las Hsp110 humanas se muestra en negra.

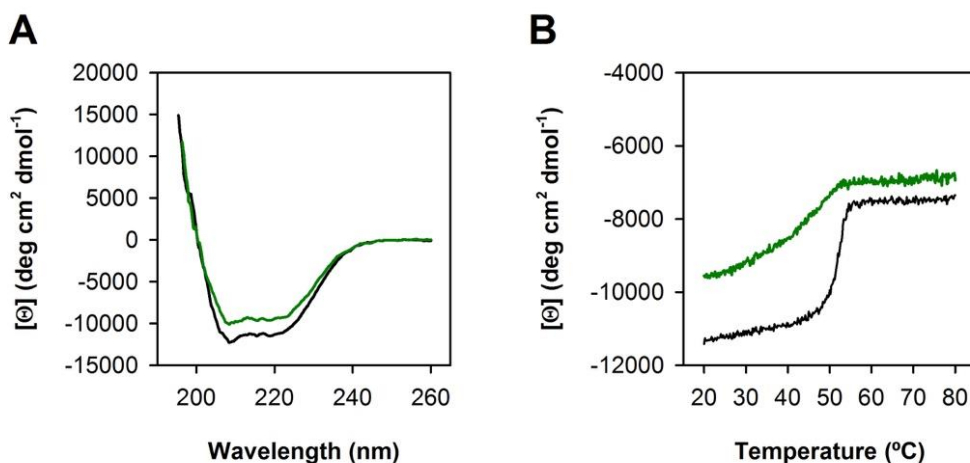


Figura 4.26: Caracterización de la estructura secundaria y desnaturalización del mutante Apg2ΔC. **A**, espectros de CD de Apg2 (líneas negras) y Apg2ΔC (líneas verdes) en ausencia de nucleótidos. **B**, desnaturalización de Apg2 (líneas negras) y Apg2ΔC (líneas verdes) siguiendo la elipticidad a 222 nm. Las rampas de temperatura se obtuvieron a 60°C/h, en ausencia de nucleótidos.

4.3.1. Propiedades estructurales de Apg2ΔC

Se realizaron ensayos de dicroísmo circular (CD) y dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) para investigar como la eliminación de la extensión C-terminal de Apg2 afectaba a la estructura y estabilidad de la proteína.

4.3.1.1. Dicroísmo circular

En primer lugar, se obtuvieron espectros de CD de Apg2 y Apg2ΔC en ausencia de nucleótidos que reflejaron para ambas proteínas una estructura secundaria con alto contenido en hélices α (Figura 4.25A). El mutante Apg2ΔC mostró un valor inferior de elipticidad molar en el pico negativo a 222 nm, indicativo de un contenido helicoidal menor. Este resultado está de acuerdo con la predicción realizada con Jpred 4. Por otro lado, se estudió la desnaturalización térmica de Apg2ΔC registrando la elipticidad a 222 nm mientras la muestra era calentada a 60°C/h (Figura 4.26B). Los resultados obtenidos con el mutante de delección mostraron un comportamiento diferente al de Apg2 silvestre. Mientras que ésta presentó una desnaturalización muy cooperativa con una transición centrada a 51°C, la desnaturalización de Apg2ΔC se caracterizó por una

pérdida gradual de estructura secundaria en una transición ancha entre 30 y 50°C. La estructura residual de Apg2 y Apg2 Δ C tras la transición fue muy similar.

Estos resultados indican que la delección del extremo C-terminal de Apg2 provoca una pérdida de la cooperatividad en la desnaturalización térmica de la proteína, lo que posiblemente esté relacionado con una estructura terciaria menos compacta. Es interesante destacar que la desnaturalización de Sse1p presenta un perfil de desnaturalización seguida por CD muy similar al observado para Apg2 Δ C (Raviol 2006).

4.3.1.2 SAXS

La caracterización por SEC-SAXS del mutante Apg2 Δ C se llevó a cabo en colaboración con el Dr. David Albesa del Instituto Biofisika. La comparación de la reconstrucción *ab initio* de Apg2 Δ C con la de Apg2 silvestre, mostró también una envuelta alargada para el mutante de eliminación de la extensión C-terminal que perdía la característica forma de V de la proteína completa (Figura 4.27).

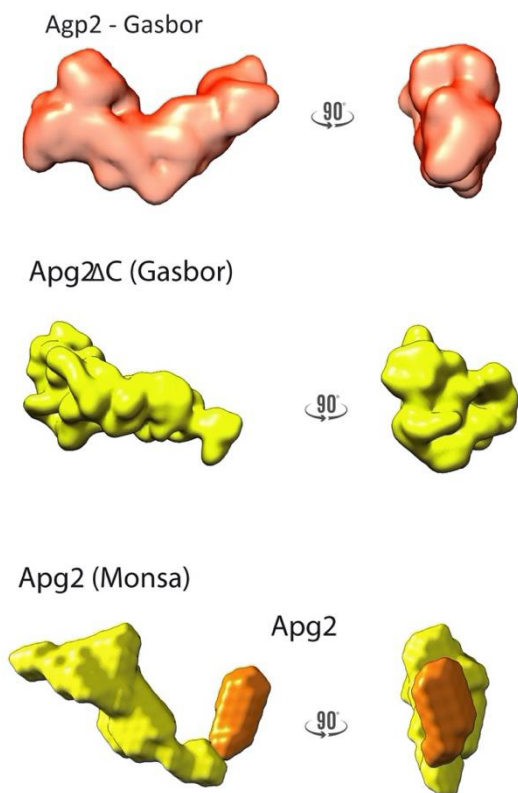


Figura 4.27: Caracterización estructural de Apg2 Δ C mediante SAXS y comparación con Apg2 silvestre. Reconstrucción *ab initio* de las envueltas de Apg2 y Apg2 Δ C empleando GASBOR y MONSA, como se indica. Los datos de SAXS (puntos negros), el correspondiente ajuste a las envueltas predichas (líneas rojas) y los valores correspondientes de χ^2 se muestran en los paneles a la derecha.

El ajuste implementado mediante MONSA de forma simultánea de las curvas de SAXS durante el modelado de ambas proteínas, permitió la ubicación *ab initio* de la extensión C-terminal que sobresale de la envuelta reconstruida de Apg2 y podría representar una prolongación del SBD α de la proteína (Figura 4.27).

4.3.2.- Cambios conformacionales de Apg2 Δ C asociados a la unión de nucleótidos

Se realizaron diversos experimentos para averiguar si la unión de ADP o ATP provocaba cambios estructurales y/o conformacionales en Apg2 Δ C. Los resultados mostrados en la Figura 4.28A demuestran que no se observaron modificaciones significativas en la desnaturalización térmica de Apg2 Δ C en presencia de nucleótidos, de acuerdo con lo observado para la proteína silvestre (Figura 4.9B). Mediante SEC, se obtuvo un V_e para Apg2 Δ C similar para las tres condiciones ensayadas (Figura 4.28B), demostrando que la unión de nucleótido no modifica el comportamiento hidrodinámico del mutante. Como se ha observado anteriormente para Apg2 y Apg2 Δ AS, Apg2 Δ C eluyó con una masa molecular aparente superior a su masa teórica. Sin embargo, el V_e (9,3 ml) fue significativamente inferior al de Apg2 silvestre (8,6 ml), lo que sugiere que la delección del segmento C-terminal modifica el comportamiento hidrodinámico de la proteína. Por último, los ensayos de proteólisis parcial de Apg2 Δ C con tripsina mostraron perfiles similares en condiciones apo y en presencia de ADP o ATP (Figuras 4.28C y D), y, por tanto, la ausencia de cambios conformacionales debidos a la unión de nucleótidos. La accesibilidad de los sitios de corte posiblemente no fue modificada por la eliminación del segmento C-terminal ya que la cinética de degradación de Apg2 Δ C fue muy similar a la de Apg2 silvestre, generando fragmentos de los que solo se observó uno alrededor de 66 kDa, coincidiendo con el encontrado para la proteína silvestre. En este caso, no se detectaron fragmentos C-terminales debido a su menor tamaño por la eliminación de los 139 residuos correspondientes a la extensión C-terminal.

Estos resultados demuestran que la ausencia de cambios conformacionales observables en el mutante de eliminación de la extensión C-terminal, como ya se había encontrado para Apg2 silvestre.

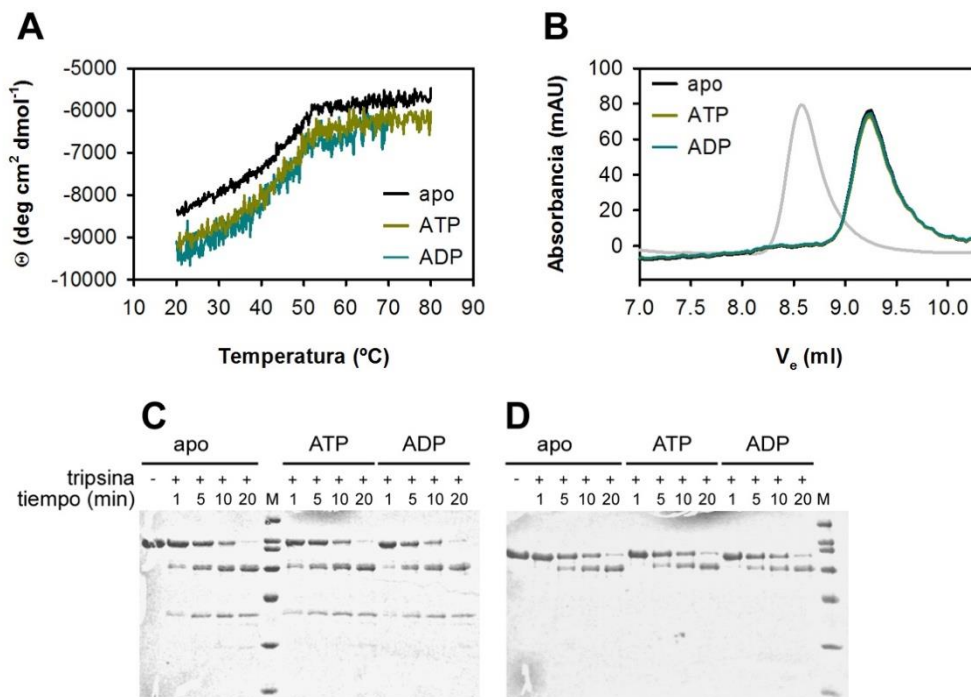


Figura 4.28: Cambios conformacionales de Apg2ΔC en ausencia o en presencia de nucleótidos. **A**, desnaturalización térmica de Apg2ΔC medida monitorizando la señal de CD de forma continua a 222 nm en ausencia de nucleótidos (línea continua) o en presencia de ADP (línea discontinua) o ATPγS (línea punteada). **B**, perfiles SEC de Apg2 (líneas grises) y Apg2ΔAS (líneas rojas) para las formas apo (líneas continuas) y unidas a ADP (líneas discontinuas) o ATP (líneas punteadas). La concentración de proteína fue 10 μM. **C** y **D**, proteólisis parcial con tripsina de Apg2 (C) y Apg2ΔAS (D) en ausencia o en presencia de nucleótidos. Apg2 silvestre (izquierda) y Apg2ΔC (derecha) fueron incubadas con tripsina durante los tiempos indicados. Los fragmentos proteolíticos fueron resueltos y visualizados mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

4.3.3.- Análisis de los complejos Hsc70:Apg2ΔC.

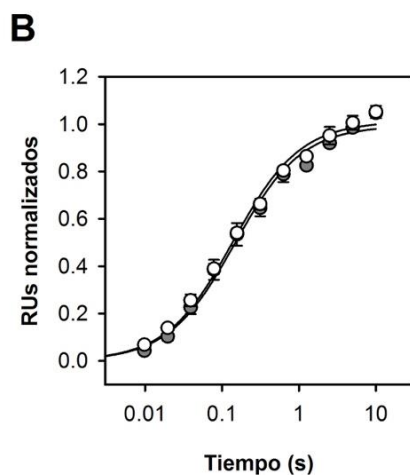
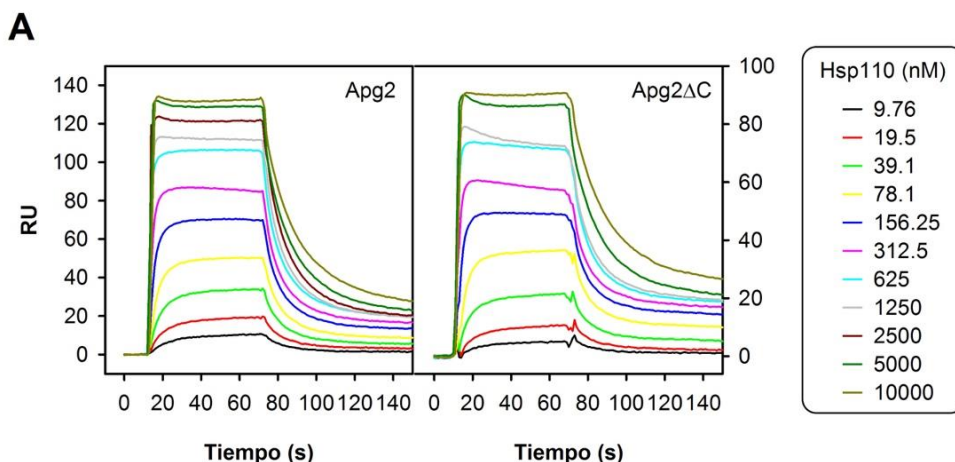
En el apartado anterior se ha demostrado que el AS, uno de los dos dominios divergentes de Apg2, dificulta la formación de complejos con Hsc70, lo que juega un papel esencial en la actividad del sistema de chaperonas. En este apartado analizamos qué papel tiene la extensión C-terminal de Apg2 en la formación de complejos con

Hsc70. Para ello se han realizado ensayos de resonancia de plasmón superficial (SPR) y electroforesis en geles nativos.

4.3.3.1.- Determinación de la afinidad del complejo Hsc70:Apg2 Δ C en ausencia de nucleótidos.

Se realizaron ensayos de SPR en los que se inyectaron concentraciones crecientes de Apg2 Δ C en ausencia de nucleótidos sobre sensores en los que se había unido Hsc70_{Strep}, empleando anticuerpos monoclonales anti-Streptag II inmovilizados covalentemente sobre la superficie del sensor. Los sensogramas mostraron una interacción fuerte caracterizada por cinéticas de asociación y disociación muy rápidas (Figura 4.29A), como también se observa para Apg2 silvestre. El ajuste a un modelo de un centro de unión de la representación de los valores máximos de RUs frente a la concentración correspondiente de Apg2 Δ C inyectada, permitió obtener una K_d de 151 ± 16 nM (Figura 4.29B), un valor muy similar al obtenido para Apg2 silvestre (148 ± 5 nM). Por tanto, estos datos indican que la extensión C-terminal de Apg2, a diferencia del AS, no interfiere en la formación del complejo con Hsc70 en ausencia de nucleótidos.

Figura 4.29 (página siguiente): Caracterización mediante SPR de la K_d del complejo Hsc70:Apg2 Δ C en ausencia de nucleótidos. A, sensogramas obtenidos tras inyecciones consecutivas de concentraciones crecientes de Apg2 Δ C (derecha) sobre un sensor que contenía Hsc70_{Strep} inmovilizada. Las concentraciones se indican según el código de colores. Por comparación se muestran los datos obtenidos para Apg2 (izquierda), de la Figura 4.13. B, curvas de unión de Apg2 (círculos blancos) y Apg2 Δ C (círculos grises) a Hsc70_{Strep}, obtenidas tras normalizar y promediar los valores de resonancia (RU) de tres experimentos independientes. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos a un modelo de unión de sitio único.



4.3.3.2.- Análisis del complejo Hsc70:Apg2ΔC en presencia de nucleótidos por electroforesis nativa.

La caracterización de la unión del mutante Apg2ΔC a Hsc70 en presencia de nucleótidos se realizó mediante experimentos similares al mostrado anteriormente para el mutante Apg2ΔAS (Figura 4.14). Así, se realizaron experimentos en los que Apg2 silvestre y Apg2ΔC compiten para unirse a Hsc70 (2 μM) en presencia de 50 μM ATP, manteniendo una de las dos Hsp110 a una concentración constante e igual a la de Hsc70, y añadiendo concentraciones crecientes de la otra. Tras la incubación a temperatura ambiente durante la noche para permitir la hidrólisis completa del ATP, los complejos obtenidos se analizaron mediante electroforesis nativa.

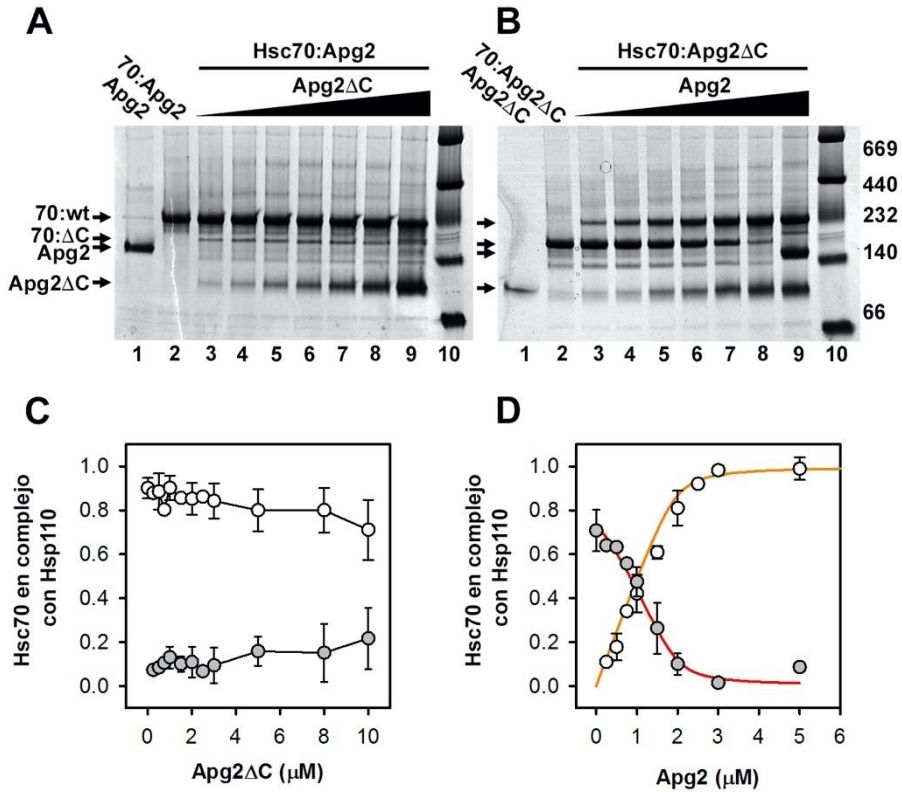


Figura 4.30: Caracterización del complejo Hsc70:Apg2ΔC y su afinidad en presencia de nucleótidos mediante electroforesis nativa. A, electroforesis nativa de Apg2 silvestre (2 μ M, calle 1), el complejo Hsc70:Apg2 (2 μ M, calle 2) y el ensayo de competición con Apg2ΔC a concentraciones (desde la calle 3): 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, y 5 μ M. **B**, como en A, Apg2ΔC silvestre (2 μ M, calle 1), el complejo Hsc70:Apg2ΔC (2 μ M, calle 2) y el ensayo de competición con Apg2 a concentraciones (desde la calle 3): 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, y 5 μ M. En ambos geles se muestran marcadores de pesos moleculares (calle 10). **C** y **D**, fracción de Hsc70 en complejos con Apg2 (círculos blancos) o Apg2ΔC (círculos grises) para los ensayos de competición a concentraciones crecientes de Apg2ΔC (C) y Apg2 (D). Los datos son la media de cuatro experimentos independientes y se muestra la desviación estándar. La línea roja representa el mejor ajuste de los datos experimentales a un modelo de unión competitiva (Wang 1995). La línea naranja se simuló con las variables obtenidas del ajuste anterior.

A diferencia de lo observado para Apg2ΔAS, el mutante Apg2ΔC migró en los geles nativos con una masa aparente inferior a la de la proteína silvestre (Figuras 4.30A y B).

Del análisis por distancia de migración en los geles de la Figura 30, se obtuvieron masas aparentes de 146 ± 4 y 105 ± 6 kDa para Apg2 silvestre y Apg2 Δ C, un 55 y 33% superiores a la masa obtenida de la secuencia (94,3 y 78,8 kDa, respectivamente). El complejo Hsc70:Apg2 Δ C, con una masa aparente de 155 ± 5 kDa, se diferenció del formado por la proteína silvestre, de masa aparente 228 ± 3 kDa (38% superior a la masa teórica de un complejo 1:1). Sorprendentemente, el complejo con el mutante de eliminación migró cerca de su masa teórica, superándola solo en un 3,5%.

Observando los ensayos de competición, se desprende claramente que existe una gran diferencia de afinidad entre Apg2 y Apg2 Δ C para unirse a Hsc70 en presencia de nucleótidos. Las titulaciones demostraron que Apg2 competía muy eficazmente con el mutante para formar complejo con Hsc70 (Figura 4.30B), mientras que concentraciones 5 veces superiores de Apg2 Δ C solo conseguían limitar ligeramente la formación del complejo con la proteína silvestre (Figura 4.30A y C). Se puede observar que a concentraciones equimolares de las tres proteínas (2 μ M) en ambos geles (calle 8), prácticamente la gran mayoría de Hsc70 se encontró unida a Apg2. Por tanto, los resultados concuerdan con que la eliminación de la extensión C-terminal provoca una gran reducción de la afinidad por Hsc70 en presencia de nucleótidos. El hecho de que el complejo de Hsc70 con Apg2 Δ C se distinga del de Apg2, permitió una estimación de las constantes de equilibrio de disociación para ambos complejos empleando un modelo de unión competitiva de dos ligandos a una proteína publicado por Wang (Wang 1995) (Figura 4.30D).

Un inconveniente importante de este método es la dificultad para cuantificar Hsc70 debido a la partición de la proteína aislada en diferentes formas oligoméricas y su pobre tinción después de la electroforesis nativa (Figura 4.14A). De hecho, no se pudo detectar Hsc70 libre en el gel de la Fig. 4.30B, donde, en presencia de Apg2 Δ C (2 μ M) y sin Apg2 añadida (calle 2), podría ser aproximadamente un 25% del total (2 μ M), si se considera una K_d similar a la observada en ausencia de nucleótidos. Para evitar estas limitaciones, se estimó la cantidad de Hsc70 total (no cargada en el gel de la Fig. 30B) a partir de la suma de las densidades de los dos complejos a altas concentraciones de Apg2 silvestre (> 5 μ M), asumiendo que Hsc70 libre es insignificante en estas condiciones. Esta es posiblemente una suposición razonable considerando las afinidades de Apg2 y Apg2 Δ C por Hsc70 (al menos similar a las estimadas en ausencia de nucleótidos). Así, la fracción de Hsc70 en complejos con Apg2 y Apg2 Δ C se cuantificó a partir de las bandas correspondientes y se referenciaron a la cantidad de Hsc70 total (Figura 4.30D). El mejor ajuste se obtuvo con valores de 192 ± 39 y 4 ± 2 nM para las

K_{ds} de los complejos de Hsc70 con Apg2 Δ C y Apg2, respectivamente. Por tanto, esto indica que Apg2 Δ C interaccionaría con Hsc70 con una afinidad similar en presencia o ausencia de nucleótidos, mientras que la afinidad de la proteína silvestre aumentaría entre 1 y 2 órdenes de magnitud en su presencia.

Estos resultados demuestran que la extensión C-terminal de Apg2 contribuye de forma importante a la interacción con Hsc70 y su eliminación provoca la reducción de la afinidad por la chaperona en casi 2 órdenes de magnitud. Debe mencionarse que la determinación con mayor precisión de las constantes de equilibrio de disociación requiere el empleo de técnicas más avanzadas y adecuadas a afinidades tan elevadas que requieren el uso de cantidades muy pequeñas de proteína, indetectables en geles nativos. Sin embargo, las condiciones de ocupación de los centros de unión de nucleótidos de Hsc70 y Apg2, posiblemente asimétricas como se ha mencionado anteriormente, dificulta el empleo de otras técnicas.

4.3.4.- Efecto de la eliminación de la extensión C-terminal de Apg2 en la actividad funcional del sistema de chaperonas humanas

Dado que la extensión del C-terminal de Apg2 contribuye de forma importante a la asociación con Hsc70 en presencia de nucleótidos es esperable que tenga un efecto marcado en la funcionalidad del sistema Hsc70/DnaJB1/Apg2. Para estudiar la influencia de este segmento de Apg2, se han realizado los siguientes ensayos funcionales con el mutante Apg2 Δ C:

- protección de la agregación de sustratos desnaturalizados,
- replegamiento de agregados proteicos,
- interacción de las chaperonas con agregados proteicos,
- medidas ATPasa del sistema de chaperonas humano,
- análisis del intercambio de nucleótidos en Hsc70.

4.3.4.1.- Protección de la agregación de sustratos proteicos por Apg2 Δ C

Se realizaron ensayos en los que LUC (0,1 μ M) fue desnaturalizada mediante incubación a 42 $^{\circ}$ C durante 30 minutos, en presencia de Apg2 o Apg2 Δ C a 0,4 y 2 μ M. Hemos demostrado en la sección anterior (apartado 4.2.4.1) que estas concentraciones de Apg2 silvestre son igualmente eficaces para proteger LUC de la agregación (Figura 4.15C) y que el sustrato puede ser reactivado con rendimientos similares tras la adición de Hsc70 y DnaJB1 (Figura 4.15B). En el caso de Apg2 Δ C, observamos que, cuando LUC

fue protegida de la agregación por este mutante a 0,4 μM , se obtuvieron porcentajes de renaturalización ligeramente superiores a los alcanzados por Apg2 silvestre (Figura

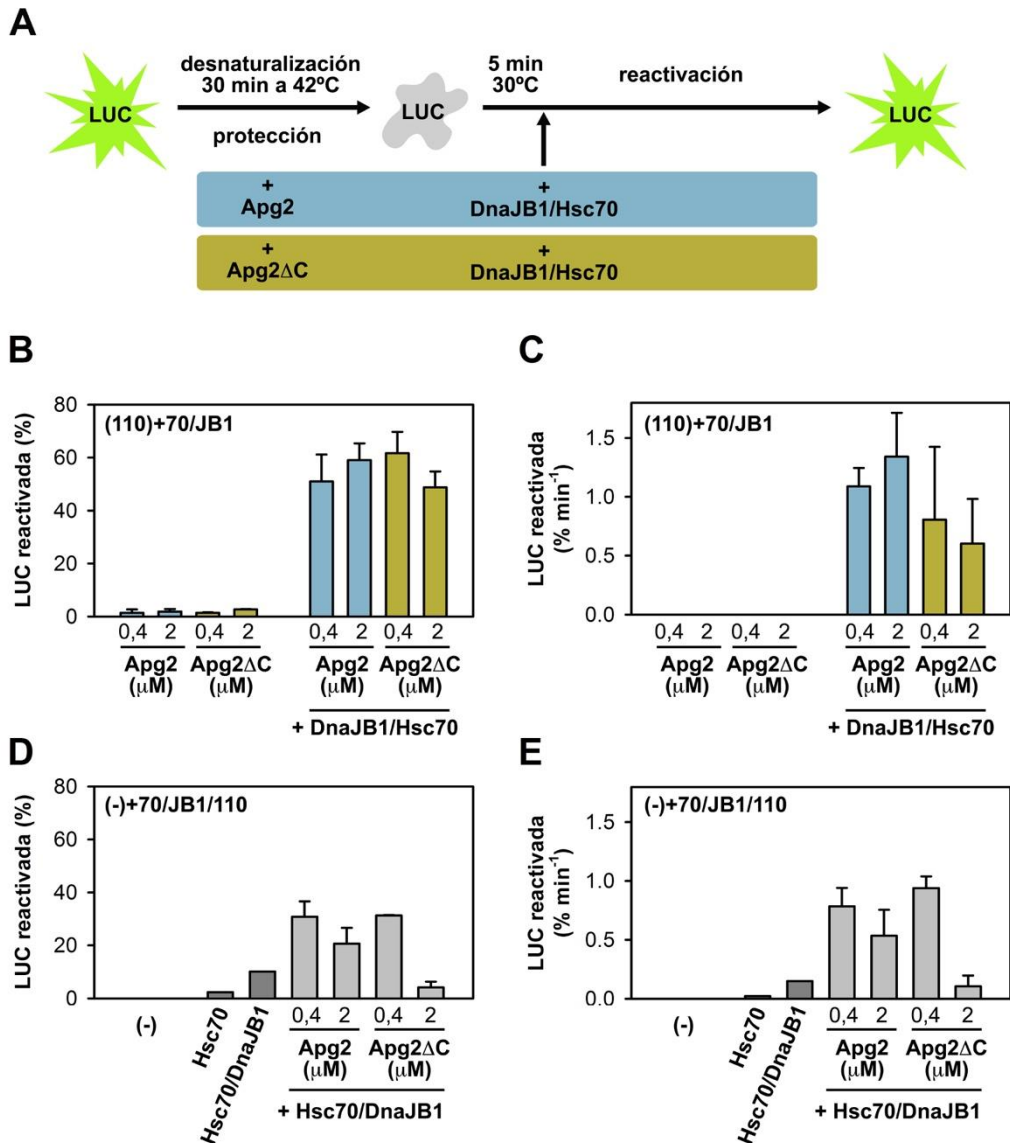


Figura 4.31: Protección de la agregación de luciferasa desnaturalizada térmicamente por Apg2 ΔC . **A**, representación esquemática de los ensayos de protección de LUC (0,1 μM) por Apg2 y Apg2 ΔC . **B**, porcentajes recuperación de la actividad de LUC protegida de la agregación con Apg2 o Apg2 ΔC a 0,4 y 2 μM ,

tras 60 min de reactivación en presencia de las chaperonas humanas, según se indica. Las concentraciones de DnaJB1 y Hsc70 fueron 1 y 2 μ M, respectivamente. C, velocidades iniciales de reactivación de los experimentos realizados en B. D, reactivación de LUC (0,1 μ M) tras desnaturalización térmica en ausencia de chaperonas. La reactivación posterior se llevó a cabo por diferentes combinaciones de chaperonas humanas según se indica. Se muestran los porcentajes obtenidos tras 60 min de reactivación. E, velocidades de reactivación correspondientes al ensayo en D.

31B), tras una hora de incubación en presencia de Hsc70 (2 μ M) y DnaJB1 (1 μ M). Sin embargo, al elevar la concentración de Apg2 Δ C a 2 μ M, se observó un descenso del 23% de la cantidad de LUC renaturalizada por parte del sistema. Al analizar las velocidades iniciales de reactivación del sustrato (Figura 4.31C), se encontró que Apg2 Δ C era más lenta que Apg2 silvestre a cualquiera de las concentraciones empleadas, especialmente a 2 μ M con una reducción de la velocidad de aproximadamente un 50%.

Cuando la desnaturalización térmica de LUC se llevó a cabo en ausencia de Apg2 o Apg2 Δ C (Figura 4.31D y E), observamos de nuevo una reactivación poco eficiente de los agregados formados por parte del sistema completo de chaperonas, como se ha observado anteriormente (Figura 4.15E). De acuerdo con los resultados expuestos en la sección anterior, el aumento de la concentración de Apg2 tuvo un efecto perjudicial en la reactivación de los agregados, observándose una reducción de aproximadamente el 30% tanto de rendimiento como de velocidad de reactivación. Este efecto fue mucho más pronunciado para el mutante Apg2 Δ C, con una reducción de la reactivación de LUC cercana al 90%. A pesar de esto, el mutante mostro una velocidad de reactivación similar a la observada para la proteína silvestre a la concentración inferior de 0,4 μ M.

Estos resultados demuestran que la delección de la extensión C-terminal de Apg2 no impide su interacción con sustratos desplegados, logrando protegerlos frente a la agregación. Sin embargo, la posterior reactivación del sustrato protegido muestra una dependencia negativa con la concentración superior a la observada para la proteína silvestre.

4.3.4.2.- Reactivación de agregados de LUC y G6PDH.

Al igual que en la sección anterior, los estudios de reactivación de agregados se llevaron a cabo con sustratos mas manejables por el sistema de chaperonas humano, como son los agregados formados por LUC (0,1 μ M) desnaturalizada con Urea 6 M y posterior

dilución del agente caotrópico, y G6PDH (2,5 μM) desnaturalizada a 50°C durante 30 minutos (Figura 32A). Se observó un comportamiento similar de la reactivación de los agregados de ambos sustratos por Hsc70 y DnaJB1 en presencia de Apg2 ΔC . A cantidades subestequiométricas (0,2 y 0,4 μM), el mutante de delección Apg2 ΔC estimuló el replegamiento de los polipéptidos agregados de modo más eficaz que Apg2 (Figura 4.32B-E). Así, a 0,2 μM las velocidades de reactivación de agregados de LUC y G6PDH en presencia del mutante de eliminación se incrementaron un 45% y un 28%, respectivamente, respecto a las de Apg2 silvestre. Este resultado es sorprendente si tenemos en cuenta que la afinidad de Apg2 ΔC por Hsc70 debería dificultar su asociación a concentraciones bajas en mayor medida que para la proteína silvestre y, como resultado, ralentizar más el ciclo funcional para el mutante. A partir de 1 μM , la concentración elevada de Apg2 produjo un efecto pernicioso en el replegamiento de los agregados, como hemos observado anteriormente. La inhibición de la reactivación fue más acuciada para Apg2 ΔC . Así, la velocidad de reactivación a 5 μM se redujo casi por completo para los agregados de LUC, y un 42% para los de G6PDH. De nuevo, este resultado contradice el efecto esperado de la afinidad reducida del complejo Hsc70:Apg2 ΔC , que debería ser compensado al elevar la concentración del mutante.

Estos resultados sugieren que la eliminación de la extensión C-terminal de Apg2 provoca una regulación de la actividad replegadora del sistema de chaperonas humanas Hsc70/DnaJB1/Apg2 que no concuerda con los efectos esperados de la disminución de la afinidad para asociarse a Hsc70. Por tanto, deben considerarse otros efectos adicionales ligados a la extensión C-terminal de Apg2.

Figura 4.32 (página siguiente): Reactivación de agregados de LUC y G6PDH por Hsc70 y DnaJB1 en presencia de Apg2 ΔC . **A**, representación esquemática de la formación de agregados de LUC y G6PDH y los ensayos de reactivación por diferentes combinaciones de las chaperonas humanas. **B** y **C**, cinética de reactivación de agregados de LUC (**B**) y G6PDH (**C**) por Hsc70/DnaJB1/Apg2 (paneles superiores) o Hsc70/DnaJB1/Apg2 ΔC (paneles inferiores) a concentraciones crecientes según se indica. **D** y **E**, velocidades iniciales de replegamiento de LUC (**D**) y G6PDH (**E**) por Hsc70 y DnaJB1 en presencia de Apg2 (símbolos blancos) o Apg2 ΔC (símbolos grises). Se muestran valores promedio y desviaciones estándar de cuatro ensayos independientes.

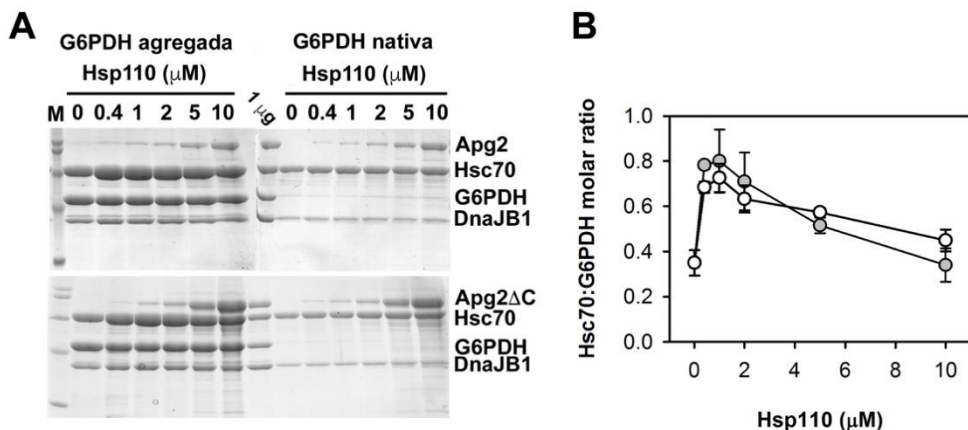


Figura 4.33: Interacción de las chaperonas humanas con agregados de G6PDH. **A**, asociación de las chaperonas humanas a agregados de G6PDH a concentraciones crecientes de Apg2 (panel superior) o Apg2ΔC (panel inferior). Como control se realizó el mismo ensayo con G6PDH nativa. Las concentraciones de Hsc70 y DnaJB1 fueron 2 y 0,5 μM, respectivamente. Se cargó 1 μg de cada proteína como referencia para la cuantificación. **B**, cantidad de Hsc70 unida al agregado de G6PDH expresada como relación molar frente al sustrato en presencia de Apg2 (círculos blancos) y Apg2ΔC (círculos grises).

4.3.4.3.- Interacción de Hsc70 con agregados de G6PDH en presencia de Apg2ΔC.

Como se ha demostrado en la sección anterior, la cantidad de Hsc70 asociada a los agregados de G6PDH correlaciona con su reactivación y, por tanto, Hsc70 es la chaperona determinante en el rendimiento final. Por ello, se estudió el efecto Apg2ΔC en la asociación de Hsc70 con agregados de G6PDH en presencia de DnaJB1. Del mismo modo que en la sección previa, se emplearon agregados formados tras la desnaturalización de G6PDH (10 μM) a 50°C durante 30 minutos que se incubaron posteriormente durante 10 minutos a 30°C con Hsc70 (2 μM), DnaJB1 (0,5 μM) y concentraciones crecientes de Apg2ΔC, usando Apg2 silvestre como control. Las proteínas coprecipitadas con el agregado se separaron por ultracentrifugación y se analizaron y cuantificaron por electroforesis en geles desnaturalizantes y densitometría (Figura 4.33A). Los resultados mostraron que la dependencia de la cantidad de Hsc70 asociada con los agregados fue similar para Apg2ΔC y Apg2, observándose una estimulación a concentraciones inferiores a 0,4 μM y una inhibición progresiva de la unión de la chaperona al subir la concentración (Figura 4.33B). Coincidiendo con los resultados de reactivación de los agregados, la cantidad de Hsc70 unida al sustrato fue

un 16% superior en presencia de Apg2 Δ C a 0.4 μ M, respecto a la proteína silvestre. Sin embargo, la asociación de Hsc70 se redujo más para el mutante a concentraciones elevadas, siendo un 24% inferior a 10 μ M.

4.3.4.4.- Efecto de la extensión C-terminal en la estimulación de la actividad ATPasa de Hsc70.

A continuación, se estudió como como la delección de la extensión C-terminal de Apg2 afectaba la actividad ATPasa del sistema de chaperonas. Para ello se determinó la actividad de mezclas de Hsc70 (2 μ M) y concentraciones crecientes de Apg2 o Apg2 Δ C, en ausencia o presencia de DnaJB1 (0,5 μ M). Como se ha demostrado en la sección previa, la activación de la ATPasa de Hsc70 se interpreta más apropiadamente siguiendo el incremento de la actividad total del sistema (Δ ATPasa), restando el incremento proveniente de la actividad intrínseca de Apg2 o Apg2 Δ C (Figura 4.34). A todas las concentraciones ensayadas, el mutante de delección Apg2 Δ C estimuló la actividad hidrolítica de Hsc70 con mayor eficacia que la proteína silvestre, obteniéndose actividades alrededor de un 20% superiores, tanto en ausencia como en presencia de DnaJB1.

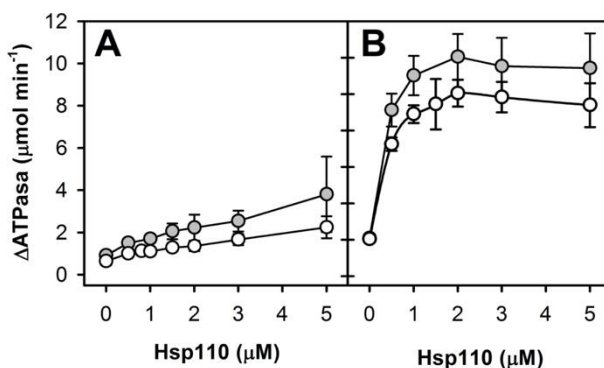


Figura 4.34: Actividad ATPasa del sistema de chaperonas humano a concentraciones crecientes de Apg2 y Apg2 Δ C. A y B, valores de Δ ATPasa de mezclas de Hsc70 (2 μ M) y concentraciones crecientes de Apg2 (círculos blancos) o Apg2 Δ C (círculos grises), en ausencia (A) y presencia de DnaJB1 (0.5 μ M) (B).

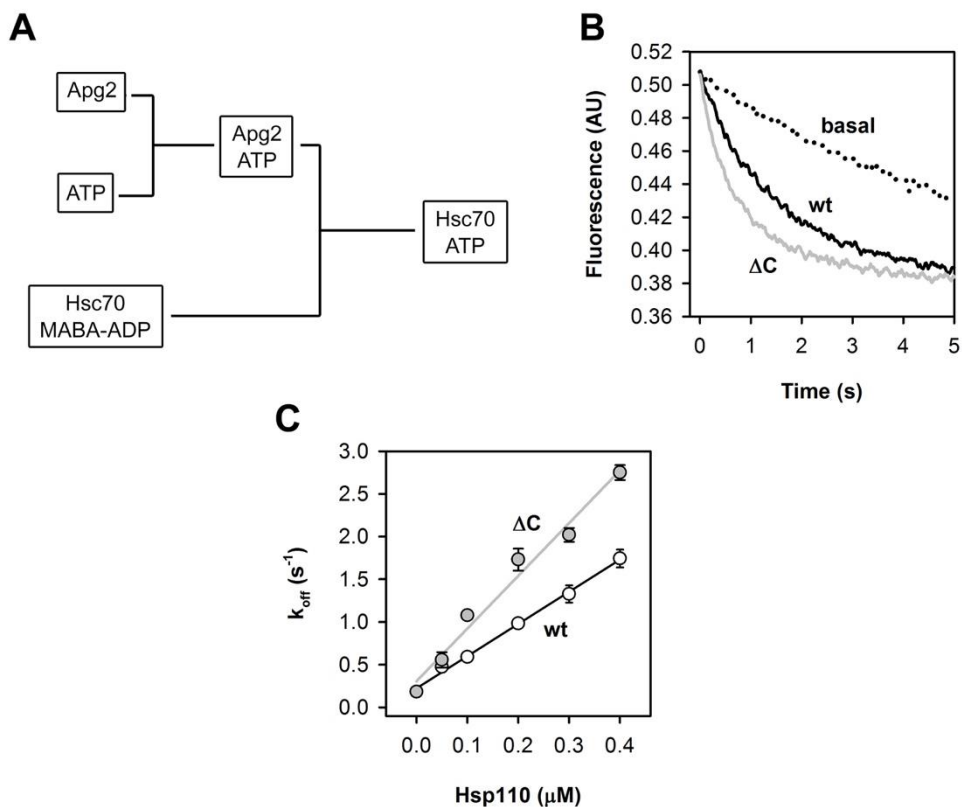


Figura 4.35: Actividad NEF de Apg2 y Apg2ΔC. **A**, representación esquemática de los ensayos de intercambio de nucleótido. **B**, registro del descenso de la intensidad de fluorescencia del MABA-ADP al liberado de Hsc70 por intercambio por ATP. **C**, constantes de disociación del MABA-ADP unido a Hsc70 a concentraciones crecientes de Apg2 (círculos blancos) y Apg2ΔAS (círculos negros).

4.3.5.- Efecto de la extensión C-terminal en el intercambio de nucleótido.

Finalmente, se realizaron ensayos de cinética rápida mediante flujo detenido para estudiar la actividad de intercambio de nucleótido del mutante Apg2ΔC. Dado que las principales diferencias entre Apg2 silvestre y el mutante se observaron en presencia de ATP, se estudio el intercambio de MABA-ADP unido a Hsc70 por ATP. Para ello se siguió un protocolo experimental como el mostrado en la Figura 4.35A, empleando concentraciones de Apg2 y Apg2ΔC en el rango 0,1-0,4 μM, para evitar una hidrólisis de ATP no deseada. Además, estas proteínas y el ATP se inyectaron de jeringas diferentes y se premezclaron durante 5 s antes de inyectarlos sobre Hsc70 unida a MABA-ADP. Los resultados obtenidos mostraron que el mutante Apg2ΔC estimula el

intercambio de nucleótido de forma mas eficiente que Apg2 silvestre en este rango de concentraciones (Figuras 4.35B y 4.35C), a pesar de su menor afinidad por Hsc70. Por tanto, estos ensayos demuestran que el segmento C-terminal de Apg2 controla el intercambio de nucleótido en Hsc70, lo que, a su vez, permite una actividad óptima del sistema de chaperonas.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En esta Tesis se ha estudiado la regulación de la actividad chaperona de Hsc70 humana para replegar sustratos desplegados y agregados proteicos por Apg2, una Hsp110, y el papel que juegan el dominio AS y la extensión C-terminal de esta. Se ha demostrado que Hsc70 es capaz de reactivar sustratos desplegados y agregados en colaboración únicamente con DnaJB1 (Nillegoda y Bukau 2015; Shorter 2011). Sin embargo, nuestros resultados muestran que Apg2 juega un papel esencial en estos procesos ya que estimula significativamente la capacidad funcional del sistema de chaperonas. La mayor eficiencia observada en la reactivación de los diferentes agregados proteicos puede sugerir la existencia de una posible actividad desagregasa en Apg2, como han observado otros autores (Mattoo et al. 2013). En este caso, la actividad de Apg2 se sumaría a la de Hsc70 y DnaJB1 para reactivar sustratos proteicos de forma eficiente. Esta hipótesis estaría relacionada con la homología estructural entre las chaperonas Hsp70 y Hsp110. Sin embargo, se desconoce con precisión si también existe homología funcional entre estas chaperonas. Estudiar la actividad funcional de Apg2 dentro del sistema de chaperonas que forma con Hsc70 y DnaJB1 es el objetivo principal de esta Tesis. Además, teniendo en cuenta que la proteína homóloga Sse1p (Hsp110 de levaduras) no es capaz de estimular la actividad desagregasa de Ssa1p (Hsp70)/Ydj1 (Hsp40), la cual depende estrictamente de la presencia de Hsp104 (Hsp100) (Rampelt et al. 2012), la actividad replegadora de Apg2 podría estar relacionada con la presencia de los dominios divergentes en la Hsp110 humana, más grandes y complejos. Por tanto, se necesita un estudio detallado de la función de estos dominios para comprender el papel de Apg2. De acuerdo con otros autores (Mattoo et al. 2013; Oh et al. 1997), Apg2 es capaz de interactuar con sustratos proteicos desplegados y prevenir su agregación de manera eficiente, como hemos observado con Luc sometida a condiciones de estrés térmico, y mantenerlos en una conformación que, posteriormente, puede ser reactivada eficientemente. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis no apoyan la existencia de una actividad desagregasa intrínseca en Apg2: primero, la presencia de Hsc70 es indispensable para el replegamiento de la luciferasa protegida de la agregación; segundo, la actividad ATPasa de Apg2 no es necesaria para la reactivación de agregados proteicos; tercero, Apg2 apenas interactúa con agregados proteicos, a diferencia de Hsc70; y cuarto, la solubilización y reactivación eficaz de los agregados solo ocurre a concentraciones subestequiométricas de Apg2. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que Apg2 desempeña un papel catalítico, actuando posiblemente como un intercambiador de nucleótido “especializado” para Hsc70, como sugieren otros autores (Andréasson et al. 2008; Andréasson et al. 2008; Polier et al. 2008; Schuermann et al. 2008). La cuestión que se debe resolver es, entonces, qué efectos funcionales de Apg2 subyacen bajo el término “especializado”.

5.1 Regulación de la actividad chaperona de Hsc70 por Apg2 y DnaJB1.

El proceso de solubilización y reactivación de un agregado proteico por el sistema de chaperonas objeto de este trabajo es un proceso complejo que depende de varios factores como: la propia naturaleza del agregado en cuestión, pues su reactivación depende de su tamaño, estabilidad y conformación (Sección 4.1 de Resultados); el correcto funcionamiento de la actividad ATPasa de Hsc70 (Figura 4.22B); las concentraciones relativas de Apg2 y DnaJB1, pues son las encargadas de acelerar el proceso mediante el intercambio de nucleótido y la activación de la ATPasa en Hsc70, respectivamente (Figura 4.23); y finalmente, la interacción de las chaperonas con la superficie del agregado a reactivar. En relación con este último punto, se debe destacar que es especialmente importante la cantidad de Hsc70 unida al agregado, que correlaciona fielmente con la actividad replegadora (Figura 5.1A). Esto sugiere que la solubilización del agregado depende de la cantidad de Hsc70 unida y que todos los polipéptidos extraídos se repliegan en las condiciones óptimas, como se ha demostrado para el sistema desagregasa bacteriano (Fernández-Higuero et al. 2018; Fernández-Higuero et al. 2020). Por tanto, es esencial describir como se une Hsc70 al sustrato agregado. De manera similar a lo que se ha observado en bacterias (Acebrón et al. 2008), en esta Tesis se demuestra que el proceso de reactivación de agregados proteicos por parte de las chaperonas humanas es un proceso secuencial en el que en primer lugar DnaJB1 se une al agregado, lo que permite transferir moléculas de Hsc70 a la superficie del mismo (Figuras 4.17 y 4.33). Aunque la chaperona también es capaz de unirse a los sustratos agregados, lo hace con muy baja afinidad, de modo que la unión previa de DnaJB1 es esencial para promover la interacción de Hsc70 con el agregado de forma efectiva, aumentando en torno a cinco veces la cantidad unida (Figura 4.17). Dado que DnaJB1 promueve la hidrólisis de ATP en Hsc70 al transferir el sustrato a la chaperona, ésta queda unida al agregado en su estado de alta afinidad (ADP). En este punto, el intercambio de ADP por ATP en Hsc70 provoca la pérdida de afinidad de la chaperona por el sustrato, quedando éste libre para poder recuperar su conformación nativa o volver a unirse a Hsc70 en caso de ser necesario. Así, la disociación de los complejos de Hsc70 con el sustrato agregado debería estar acelerada por el rol canónico de Apg2 como intercambiador de nucleótido para Hsc70 (Andréasson et al. 2008; Polier et al. 2008; Schuermann et al. 2008) (Figura 5.2). Sin embargo, hemos observado que Apg2 a concentraciones subestequiométricas duplica la cantidad de Hsc70 reclutada por DnaJB1 (figura 4.17), de acuerdo con resultados de otros autores obtenidos con agregados amiloides (Wentink et al. 2020).

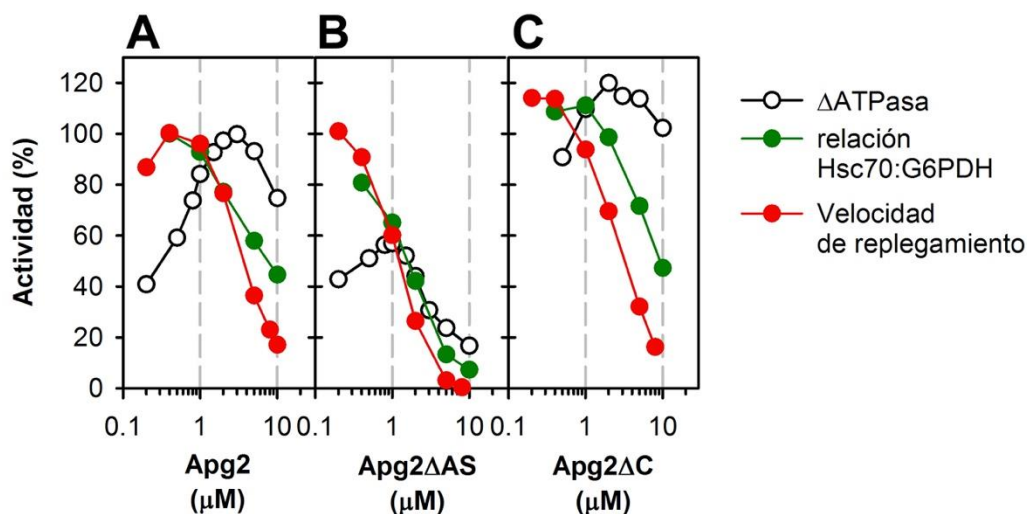


Figura 5.1: Regulación de la ATPasa, unión de Hsc70 a los agregados y su plegado por Apg2. Comparación de la actividad de la ATPasa (negro), unión de Hsc70 a los agregados de G6PDH (verde) y su replegamiento (rojo) a concentraciones crecientes de Apg2 (A), Apg2ΔAS (B) y Apg2ΔC (C). Los datos se han normalizado tomando como 100% el valor máximo obtenido con Apg2 silvestre para cada una de las actividades que se muestran. Se han omitido las barras de error por motivos de claridad.

Para entender este comportamiento se debe considerar el ciclo ATPasa de Hsc70 que se ve acelerado directamente por ambas cochaperonas: DnaJB1, que activa la hidrólisis de ATP, y Apg2, que devuelve a Hsc70 a su conformación unida a ATP al estimular el intercambio de nucleótido (Figura 5.2). De todos los posibles estados de Hsc70 dependientes de nucleótidos del ciclo ATPasa, solo el estado Hsc70(ATP) puede transferirse al agregado por la acción de DnaJB1 unida a él (Figura 37). De este modo, Apg2 puede inducir un incremento de la cantidad de Hsc70 unida a un agregado al incrementar la cantidad de Hsc70(ATP) disponible. Es importante destacar aquí que, aunque la unión de la Hsp70 mediada por Hsp40 es similar en el sistemas humano y bacteriano, la eficiencia del sistema de chaperonas humano es muy superior, promoviendo la unión a la superficie del agregado de en torno al 40% del total de Hsc70 en el medio, alcanzándose una relación molar entre Hsc70 y agregado aproximadamente ocho veces mayor a la descrita para el sistema bacteriano (Fernández-Higuero et al. 2018). Este hecho es importante ya que podría tratarse de un mecanismo de compensación ante la ausencia en el genoma humano de desagregasas de la familia Hsp100, indispensables para la reactivación de agregados en bacterias y levaduras.

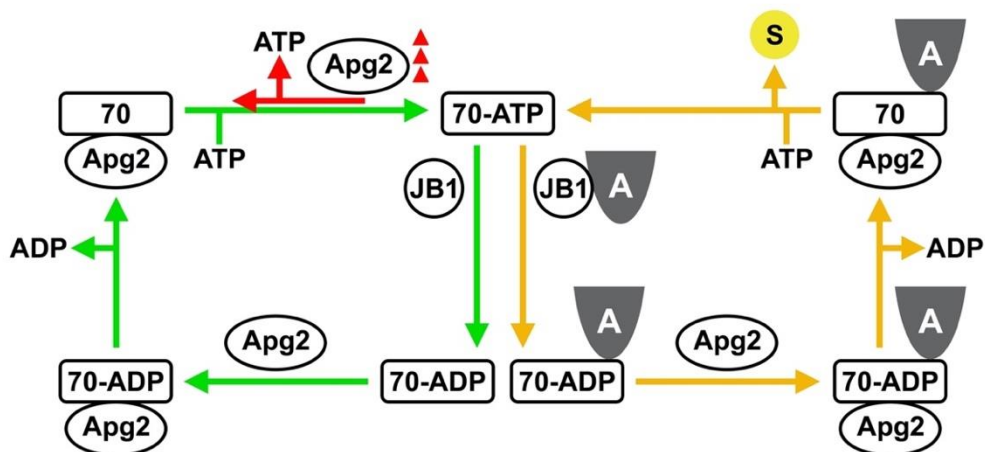


Figura 5.2: Ciclo ATPasa de Hsc70 y su interacción con agregados proteicos. El ciclo de unión de ATP y su hidrólisis por Hsc70 (flechas verdes) se ve estimulado por las cochaperonas DnaJB1 y Apg2, que actúan estimulando la hidrólisis y el intercambio por hidrólisis de ADP por ATP, respectivamente. Las flechas rojas indican los procesos que ralentizan el ciclo hidrolítico favorecidos a concentraciones altas de Apg2. Las moléculas de DnaJB1 unidas a los agregados (A) facilitan la unión de Hsc70(ATP) a su superficie (flechas naranjas). La acción de Apg2 favorece la unión de ATP y la liberación del sustrato que puede plegarse en su conformación nativa (S).

Por lo expuesto anteriormente, se deduce que la etapa limitante del proceso de reactivación se encuentra definida por la cantidad de moléculas de Hsc70 capaces de unirse al agregado, es decir de la población de Hsc70(ATP). Para que Hsc70(ATP) se mantenga en niveles óptimos, la relación en las concentraciones de DnaJB1 y Apg2 deben encontrarse balanceadas. De esta manera, cualquier fluctuación fuera del rango óptimo de dichas concentraciones conlleva la desregulación del sistema que, en la mayor parte de los casos, resulta en una inhibición de la capacidad reactivadora de Hsc70. Esto está evidenciado por los ensayos en los que se ha titulado la concentración de las cochaperonas (Figuras 4.16 y 4.23 de Resultados). Como se ha observado para otras proteínas de la familia Hsp40 (Celaya et al. 2016; Laufen et al. 1999; Rauch y Gestwicki 2014; Tzankov et al. 2008) nuestros datos muestran que concentraciones altas de DnaJB1 resultan perjudiciales para la actividad de Hsc70, siendo los efectos mayores en ausencia de Apg2 (Figura 4.23 de Resultados). No está claro el motivo por el cual las chaperonas Hsp40 inhiben la reactivación de agregados a concentraciones

altas, pero se ha asociado a la posible ocupación de sitios de unión en la superficie del agregado y con efectos adversos en pasos subyacentes relacionados con el replegamiento de los polipéptidos extraídos (Acebrón et al. 2008; Celaya et al. 2016). Además, la hidrólisis acelerada de ATP provocada por la concentración elevada de DnaJB1 en el medio podría dificultar la transferencia de Hsc70 al agregado, dependiente únicamente de las moléculas de DnaJB1 asociadas a él (Figura 5.2). Del mismo modo, el aumento de la concentración de Apg2 tiene un gran impacto negativo en la reactivación de agregados y en la interacción de Hsc70 con los mismos (Figuras 4.16 y 4.17 de Resultados), lo que también se ha observado para otras proteínas NEF (Celaya et al. 2016; Gässler et al. 2001; Rg et al. 1997; Sugimoto et al. 2008; Tzankov et al. 2008). El aumento de la actividad NEF a concentraciones altas de Apg2 puede favorecer la disociación de Hsc70 del agregado y, en general, se ha asociado a una reducción de la capacidad replegadora de Hsp70 por la modificación del tiempo que el sustrato proteico pasa unido a la chaperona (Gässler et al. 2001; Sugimoto et al. 2008). Nuestros datos indican que solo cuando la concentración de Apg2 presente en el medio es subestequiométrica con respecto a la de Hsc70, la reactivación es eficiente. En estas condiciones, la relación molar Apg2:Hsc70 en la superficie del agregado es 1:80, lo que pone de relevancia el papel catalítico de Apg2. Este dato apoya la hipótesis del rol de las chaperonas Hsp110 como NEF especializados en la extracción de polipéptidos desplegados, frente a una actividad mecánica sobre los polipéptidos agregados en cooperación con Hsc70.

La diferencia principal entre la regulación del sistema de Hsc70 humana por Apg2 frente a otros NEFs no relacionados reside en la regulación de la actividad ATPasa. A bajas concentraciones de Apg2, la actividad ATPasa de Hsc70 se incrementa en torno a cinco veces con respecto a la observada en presencia de DnaJB1 solamente (Figura 4.21 de resultados). Sin embargo, una vez se sobrepasan las condiciones equimolares de Apg2 respecto a Hsc70, el exceso de Apg2 comienza a influir negativamente en la actividad ATPasa total de sistema. Este comportamiento inhibitorio es más evidente a concentraciones de Apg2 superiores a 5 μ M. Se han encontrado resultados similares con Hsp105 humana (Tzankov et al. 2008; Yamagishi et al. 2004). Frente a estas dos Hsp110, la actividad ATPasa de Hsc70 y DnaK se ve estimulada por Bag1 y HspBP1 humanas, y GrpE bacteriana, respectivamente, alcanzando una saturación en un rango de concentración similar al utilizado aquí (Flaherty et al. 1990; Ung et al. 2013; Yan et al. 2011). Por lo tanto, el efecto inhibitorio de la actividad ATPasa de Hsc70 es específico de las Hsp110 humanas. La pregunta, entonces, es cómo inhibe el ciclo de ATPasa de Hsc70 la alta concentración de Apg2. Debido al papel de Apg2 como NEF de Hsc70, el punto más razonable para detener el ciclo sería el proceso de intercambio de ADP/ATP,

que consiste básicamente en la unión de Apg2 a Hsc70(ADP), la disociación del ADP y la unión de ATP, concomitante con la disociación del complejo (Figura 5.1). Sin embargo ninguna de estas etapas puede explicar la reducción de la tasa de hidrólisis de ATP: 1) la formación del complejo Hsc70(ADP):Apg2 esta favorecida a concentraciones altas de Apg2 (figura 4.13, Resultados); 2) los ensayos de intercambio de ADP muestran que la disociación de ADP aumenta y se satura con la cantidad de Apg2 (Figura 4.20 de Resultados); 3) la disociación del complejo Hsc70:Apg2 tras la unión de ATP es intrínsecamente independiente de la concentración de las proteínas. Una explicación posible de la inhibición de la actividad ATPasa sería la asociación de Apg2 a Hsc70(ATP), como se ha observado para Hsp105 humana y Sse1 de levaduras (Rauch y Gestwicki 2014; Raviol, Bukau y Mayer 2006) . Este evento de unión estaría favorecido a altas concentraciones de Apg2 y podría provocar la liberación prematura de ATP antes de la hidrólisis (Figura 5.1, flechas rojas), lo que reduciría la actividad ATPasa. En este modelo, se establece una competición entre Apg2 y DnaJB1 para unirse a Hsc70(ATP), promoviendo la estimulación del ciclo conformacional de Hsc70 y su actividad chaperona a relaciones molares Apg2:DnaJB1 bajas, mientras que el aumento de la concentración de Apg2 favorecería la disociación del ATP y la inhibición del sistema. Al disminuir la población de Hsc70(ATP), la conformación competente para ser reclutada al agregado por DnaJB1, Apg2 inhibiría también el replegamiento de agregados a concentraciones altas. Este modelo explica la ralentización de las cinéticas de disociación del péptido FT7 observadas a concentraciones altas de Apg2 (Figura 4.18 de Resultados): la disociación del ATP de Hsc70 aumentaría la población de la conformación apo, capaz de unir péptidos que fueron previamente liberados por la unión de ATP. De este modo, se establecería un proceso secundario de asociación favorecido a concentraciones altas de Apg2, que se opondría a la disociación del péptido. El modelo propuesto asocia la actividad ATPasa al replegamiento ya que la competición entre DnaJB1 y Apg2 por unir Hsc70(ATP) afecta a ambos procesos. Sin embargo, no existe una correlación directa entre la actividad ATPasa y la actividad chaperona del sistema Hsc70/DnaJB1/Apg2, como también se ha observado para los homólogos bacterianos (Chang 2010). Así, la inhibición de la actividad ATPasa del sistema se observa a concentraciones de Apg2 mucho más altas que las que resultan inhibitorias para el replegamiento (Figura 5.1). Es posible que la competición entre DnaJB1 y Apg2 no tenga tanto efecto sobre la actividad ATPasa, un proceso mucho menos sensible a la población de Hsc70(ATP) que el replegamiento de agregados, por lo que su inhibición requiera concentraciones mucho mayores de Apg2.

En resumen, los datos obtenidos en esta Tesis indican que: 1) el factor limitante del proceso de reactivación de agregados proteicos se encuentra definido por la población

de Hsc70(ATP), la conformación que puede ser transferida al agregado por DnaJB1; 2) Apg2 acelera el intercambio de ADP/ATP en Hsc70 libre aumentando la población de Hsc70(ATP), lo que favorece la asociación de la chaperona al agregado; 3) la reactivación se produce de manera eficiente a relaciones subestequiométricas de Apg2 con respecto a DnaJB1; 4) a concentraciones altas de Apg2 se puede dar un proceso de asociación a Hsc70(ATP) que provoca la liberación del ATP, lo que se traduce en una inhibición de la actividad ATPasa del sistema y del replegamiento. El mantenimiento de la funcionalidad del sistema Hsc70 *in vivo* está asegurado por una regulación estricta de las concentraciones de ambas cochaperonas, siendo la cantidad de Hsp110 aproximadamente igual a la de Hsp40 en condiciones normales, y menos abundante después de un estrés térmico (Hageman et al. 2011; Rampelt et al. 2012).

5.2 Función de los dominios AS y la extensión C-terminal en la formación de los complejos Hsc70:Apg2.

Los estudios realizados con los mutantes Apg2 Δ AS y Apg2 Δ C demuestran que ambos dominios están implicados en la interacción de Apg2 con Hsc70. El análisis realizado mediante SPR y electroforesis nativa de la formación del complejo Hsc70:Apg2 con la proteína silvestre muestra que:

- 1.- Apg2 interacciona con Hsc70 con una K_d de, aproximadamente, 150 nM en ausencia de nucleótidos (estado apo) (Figura 4.13 de Resultados).
- 2.- En presencia de ADP la afinidad se reduce significativamente (Figura 4.13 de Resultados), mientras que en presencia de ATP no se observa interacción.
- 3.- Cuando Apg2 y Hsc70 se incuban en presencia de ATP durante el tiempo necesario para que se produzca la hidrólisis completa del nucleótido, se forma un complejo de alta afinidad con una K_d de aproximadamente 4 nM (Figura 4.30 de Resultados).
- 4.- La afinidad de Apg2 por el NBD de Hsc70 es menor que por la proteína entera, con una reducción de la K_d del complejo a 1,8 μ M (Figura 4.13 de Resultados).

En conjunto, estos resultados indican que el complejo de alta afinidad entre Hsc70 y Apg2 requiere la unión de nucleótidos y sugieren que es asimétrico con respecto al nucleótido unido, de modo que Hsc70 se encuentra en estado apo o asociada a ADP, mientras que Apg2 está unida a ATP. Esta hipótesis está respaldada por las estructuras

cristalinas de los complejos Hsp70:Hsp110 resueltas, en las que ambas proteínas se encuentran unidas a nucleótidos diferentes (Polier et al. 2008; Schuermann et al. 2008). A pesar de la dependencia de nucleótidos para la formación del complejo Hsc70:Apg2 de alta afinidad, observamos que las proteínas también interactúan en forma apo, lo que puede deberse a la flexibilidad conformacional inherente de estas conformaciones, pero, en las condiciones asimétricas de nucleótido, la afinidad del complejo aumenta significativamente con una K_d de 4 nM frente a 150 nM en conformación apo. La configuración asimétrica del complejo supone que la hidrólisis de ATP por Apg2 debe inhibirse al formar el complejo, lo que está de acuerdo con que ni la estimulación de la actividad ATPasa, ni el replegamiento de agregados, se vean afectados por el mutante Apg2-D7S, que carece de actividad ATPasa (Figuras 4.21 y 4.22 de Resultados). En la estructura cristalina del complejo Ssa1:Sse1 de levaduras, varios residuos del NBD de Ssa1 contactan con el ATP unido a Sse1 (Polier et al. 2008), lo que puede estar relacionado con el requisito del nucleótido para formar el complejo y la inhibición de su hidrólisis. Finalmente, los SBDs de Hsc70 bovina y Sse1 se encuentran próximos en el espacio, pero no participan en la interacción entre ambas proteínas en la estructura del complejo (Schuermann et al. 2008). Sin embargo, la eliminación del SBD de Ssa1 reduce moderadamente la afinidad del complejo con Sse1 (Polier et al. 2008; Raviol et al. 2006). En el caso de las proteínas humanas, la reducción de afinidad al estudiar la interacción de Apg2 con el NBD de Hsc70 es mucho más importante (unas 10 veces) y sugiere que los SBDs están involucrados en la formación del complejo mediante contactos directos. Una posibilidad alternativa, que no puede ser descartada, es que la conformación de Hsc70 que interactúa con alta afinidad con Apg2 dependa de la comunicación alostérica entre el NBD y SBD. De este modo, la eliminación del SBD reduciría la afinidad al modificar la interfase alostérica de Hsc70.

Los resultados obtenidos sobre la formación de complejos entre Hsc70 y los mutantes Apg2 Δ AS y Apg2 Δ C demuestran que el dominio AS y la extensión C-terminal de Apg2 están involucrados en la interacción entre ambas proteínas, pero la regulan de forma diferente. Mientras que el AS disminuye la afinidad de Apg2 por Hsc70 en cualquier estado nucleotídico de las proteínas, la extensión C-terminal la aumenta de forma dependiente de nucleótidos. La eliminación del AS provoca un incremento de 3 veces en la afinidad observada para la formación de los complejos entre ambas chaperonas en estado apo (Figura 4.13 de Resultados). La afinidad mayor del mutante Apg2 Δ AS por Hsc70 también se observó en presencia de nucleótidos como se demuestra en los experimentos de competición con Apg2 silvestre analizados por electroforesis nativa y medidas de la actividad ATPasa, aunque no se pudieron determinar con fiabilidad las constantes de disociación de estos ensayos (Figuras 4.14 y 4.24 de Resultados). Por el

contrario, la eliminación de la extensión C-terminal no tiene ningún efecto en la afinidad del complejo cuando las proteínas se encuentran en forma apo (Figura 4.29 de Resultados), pero afecta de forma muy significativa al complejo asimétrico de alta afinidad (Figura 4.30 de Resultados). En estas condiciones, la afinidad de Apg2 Δ C por Hsc70 fue muy similar a la observada en apo, con K_d s 192 nM frente a 151 nM, respectivamente. Estas K_d s son, a su vez, similares a la obtenida para el complejo con Apg2 silvestre en ausencia de nucleótidos (148 nM). Por tanto, la ganancia de afinidad del complejo asimétrico con Apg2 silvestre ($K_d = 4$ nM) depende directamente de la extensión C-terminal. De acuerdo con nuestros resultados, la delección de la extensión C-terminal de Sse1, mucho más corta, también reduce la afinidad por Ssa1 (Dragovic et al. 2006). Estos datos también sugieren que la extensión C-terminal de Apg2 sufre un cambio conformacional dependiente de la unión de ATP que promueve su interacción con Hsc70. Sin embargo, no observamos ningún cambio conformacional significativo con Apg2 aislado tras la unión de nucleótidos (Figura 4.28 de Resultados), de acuerdo con resultados publicados (Raviol et al. 2006). Dado el carácter desordenado de la extensión C-terminal, es plausible que un cambio conformacional de esta región proteica no pueda ser detectado por las técnicas utilizadas (CD y proteólisis parcial). Alternativamente, el cambio conformacional de este segmento de Apg2 podría depender de la presencia del NBD de Hsc70, de modo que solo tiene lugar cuando se forma el complejo. Es importante mencionar aquí, que mediante un análisis de perturbación de desplazamiento químico por RMN, realizado por otros miembros del grupo de investigación en colaboración con el grupo del Dr. Oscar Millet del CIC Biogune, se ha demostrado que la extensión C-terminal de Apg2 interacciona directamente con el NBD de Hsc70 (manuscrito en preparación al escribir esta Tesis).

La falta de datos estructurales sobre el dominio AS complican entender como este dominio de Apg2 regula la afinidad por Hsc70. En la estructura de Sse1 aislada o en complejo con el NBD de Ssa1, este dominio, mucho más pequeño en la proteína de levadura, se encuentra desordenado (Liu et al. 2007; Polier et al. 2008), pero forma una horquilla β en complejo con una construcción de Hsc70 bovina que contiene el NBD y un fragmento del SBD, que se sitúa muy próxima a este último (Schuermann et al. 2008). Por otro lado, nuestros resultados muestran que la diferencia de afinidad entre Apg2 silvestre y Apg2 Δ AS para unirse a Hsc70, casi desaparece cuando se emplea el NBD de la chaperona (Figuras 4.13 y 4.14, y Tabla 4.2 de Resultados). En conjunto, estas observaciones sugieren que el AS de Apg2 puede interactuar con el SBD de Hsc70. La secuencia particular de este segmento es propensa a contener partes desordenadas (Dublang 2021), que podrían ser reconocidas como pseudosustrato por Hsc70 y contribuir a aumentar la afinidad del complejo, como se ha observado para GrpE y DnaK

de *E. coli* (Brehmer et al. 2004; Moro et al. 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos con el mutante Hsc70-V438F descartan esta posibilidad (Tabla 4.2 de Resultados). Por tanto, nuestro estudio sugiere que el AS reduce la afinidad del complejo Hsc70:Apg2 al interactuar con el SBD de Hsc70. Posiblemente esto se consigue mediante la modificación de la interfase alostérica entre NBD y SBD de Hsc70 para favorecer una conformación que interactúe con Apg2 con menor afinidad. Otra posibilidad es que la interacción del AS con el SBD de Hsc70 modifique o suprima otras interacciones estabilizantes del complejo. Mediante este tipo de mecanismos, el AS podría actuar como un interruptor molecular en respuesta a la unión de nucleótidos para facilitar la disociación del complejo entre Hsc70:Apg2, favoreciendo, de este modo, la progresión del ciclo de la chaperona.

5.3. Efecto del AS y la extensión C-terminal de Apg2 en la actividad chaperona de Hsc70.

Los dos dominios divergentes de Apg2, el AS y la extensión C-terminal, tienen efectos marcados sobre la funcionalidad del sistema de chaperonas formado por Hsc70/DnaJB1/Apg2, que correlacionan con su implicación en la interacción con Hsc70. En el caso del AS, el mutante Apg2 Δ AS provoca una inhibición abrupta del ciclo ATPasa a concentraciones superiores a 1 μ M y, a su vez, de la reactivación de agregados proteicos, que estrecha mucho el rango de concentraciones de Apg2 a las que el sistema es eficiente (Figura 5.1). Mientras que con Apg2 silvestre, el sistema mantiene una actividad replegadora por encima del 75 % entre 0,2 y 2 μ M, para el mutante Apg2 Δ AS esto solo ocurre a 0,2-0,4 μ M (Figura 5.1A y B). A concentraciones superiores a 5 μ M, Apg2 Δ AS inhibe totalmente la actividad replegadora del sistema que correlaciona con la supresión casi total de la unión de Hsc70 al agregado. La inhibición de ambas actividades es compatible con el modelo propuesto en la Figura 5.2, considerando que la eliminación del AS favorece mucho la reasociación de Apg2 con Hsc70(ATP). Así, Apg2 Δ AS promovería una mayor liberación del ATP antes de la hidrólisis que la proteína silvestre, frenando la actividad del sistema a concentraciones mucho menores. Esta hipótesis está de acuerdo con los experimentos de competición entre Apg2 y Apg2 Δ AS seguidos mediante medidas de la actividad ATPasa del sistema (Figura 4.24 de Resultados), en los que se demuestra que el mutante truncado tiene mayor afinidad por Hsc70 en presencia de nucleótidos. Además, en presencia de una cantidad inhibitoria de Apg2 Δ AS, la recuperación de la actividad replegadora del sistema por DnaJB1 ocurre a concentraciones mayores que para la proteína silvestre (Figura 4.23 de Resultados), lo que sugiere que el mutante truncado compite mejor con DnaJB1 por unirse a Hsc70(ATP) que Apg2. Ambos ensayos apoyan la hipótesis de que

Apg2 interactúa mejor con Hsc70(ATP) cuando se elimina el AS. Por tanto, los datos funcionales sugieren que el papel fundamental del AS sería favorecer la disociación de los complejos Apg2:Hsc70 y, especialmente, de los que Apg2 puede formar con Hsc70(ATP) para favorecer la interacción de la chaperona con DnaJB1 y facilitar la progresión de su ciclo funcional.

En cuanto a la extensión C-terminal de Apg2, el efecto funcional más destacable, que se ha observado tras su delección, es un incremento de aproximadamente 1,6 veces de la velocidad de intercambio de nucleótido en el rango de concentraciones estudiado (Figura 4.35 de Resultados), debido a la interacción directa de este segmento con el NBD de Hsc70. De manera diferente, la eliminación de los últimos 44 residuos de Sse1 abolió completamente el intercambio de nucleótidos *in vitro* (Dragovic et al. 2006). Sin embargo, el mismo mutante pudo complementar el fenotipo sensible a la temperatura de una cepa de levadura *sse1Δ* (Shaner et al. 2004), lo que posiblemente requiere una actividad NEF funcional. La discrepancia entre estos dos trabajos señala que el papel preciso del segmento C-terminal de Sse1 todavía está mal definido. El incremento moderado de la actividad NEF de Apg2ΔC se corroboró mediante otros ensayos funcionales en los que, en comparación con la proteína silvestre, encontramos: i) un incremento del 20-30% de la actividad ATPasa del sistema de chaperonas (Figura 4.34 de Resultados); ii) un aumento de la reactivación de agregados proteicos a concentraciones de Apg2ΔC inferiores a 0,4 μM (Figura 4.32 de Resultados), y; iii) una inhibición más rápida de la reacción de replegamiento de proteínas a medida que se aumenta la concentración de Apg2ΔC (Figura 4.32 de Resultados). Cabe señalar que las diferencias pequeñas, pero significativas, con Apg2 silvestre en intercambio de nucleótidos, ATPasa y replegamiento de agregados en presencia de Apg2ΔC están posiblemente condicionadas por la afinidad significativamente menor del mutante por Hsc70 que limita la interacción con la chaperona, especialmente a concentraciones bajas. Un aumento del intercambio ADP/ATP debe ser favorable para la actividad ATPasa a cualquier concentración de Apg2, ya que facilita la progresión del ciclo. Esto está de acuerdo con que proteínas con menor actividad NEF como Bag1 (Rampelt et al. 2012), estimulen menos la ATPasa de Hsp70 (Tzankov et al. 2008). Sin embargo, el replegamiento de agregados solo se ve favorecido por un intercambio ADP/ATP más rápido a bajas concentraciones de Apg2ΔC, que posiblemente compensa la deficiente interacción con Hsc70. Como se ha discutido anteriormente, el aumento del intercambio de nucleótidos al elevar la concentración de las proteínas NEF inhibe el replegamiento de agregados (Celaya et al. 2016; Gässler et al. 2001; Rg et al. 1997; Sugimoto et al. 2008; Tzankov et al. 2008), por lo que es esperable que Apg2ΔC inhiba

esta actividad a concentraciones menores que la proteína silvestre. Es importante mencionar que la cantidad de Hsc70 unida al agregado no correlaciona con su reactivación para Apg2 Δ C, como se observa para Apg2 silvestre y Apg2 Δ AS (Figura 5.1), lo que sugiere que no se repliegan todos los polipéptidos que son extraídos del agregado por Hsc70. Posiblemente, el exceso de intercambio ADP/ATP reduzca el repliegamiento de los polipéptidos extraídos por una liberación prematura de Hsc70, como se ha sugerido (Gässler et al. 2001; Sugimoto et al. 2008). Algo similar se puede observar a concentraciones superiores a 5 μ M de Apg2 silvestre.

La concentración absoluta de las chaperonas humanas *in vivo* es desconocida, pero Apg2 es alrededor de 10 a 30 veces menos abundante que Hsc70 en condiciones fisiológicas (Finka et al. 2015; Hageman et al. 2011). En proporciones aproximadamente similares de Hsc70:Apg2, hemos demostrado que el mutante Apg2 Δ C es un NEF más eficiente para Hsc70 que la proteína silvestre, promoviendo una reactivación más rápida de agregados de proteínas *in vitro* (Figura 4.32 de Resultados). Esto plantea una pregunta intrigante: ¿por qué las proteínas Hsp110 humanas tienen una extensión C-terminal larga en lugar de una secuencia más corta como en Sse1 de levaduras? En un medio celular donde el conjunto de moléculas de Hsc70 tiene que realizar muchas tareas diferentes, es muy probable que una interacción de alta afinidad con Hsc70, proporcionada por la extensión C-terminal, sea esencial ya que la Hsc70 libre podría ser escasa. De este modo, se asegura que la población de Hsc70(ATP) sea la óptima para ser transferida al agregado por DnaJB1. En levaduras, la reactivación de agregados se produce en cooperación con la potente disgregasa Hsp104 y puede que no requiera la unión de tanta Hsp70 como en metazoos. Además, la extensión C-terminal podría desempeñar un papel importante de Apg2 en otras funciones especializadas menos conocidas, esenciales para la viabilidad celular (Aguado et al. 2015). Finalmente, este subdominio de Apg2 es el objetivo de varias modificaciones postraduccionales como fosforilaciones (Velasco et al. 2019) y ubiquitinaciones (Akimov et al. 2018; Wagner et al. 2011), entre otras, que podrían modificar la interacción con el NBD de Hsc70 y regular la actividad del sistema de chaperonas.

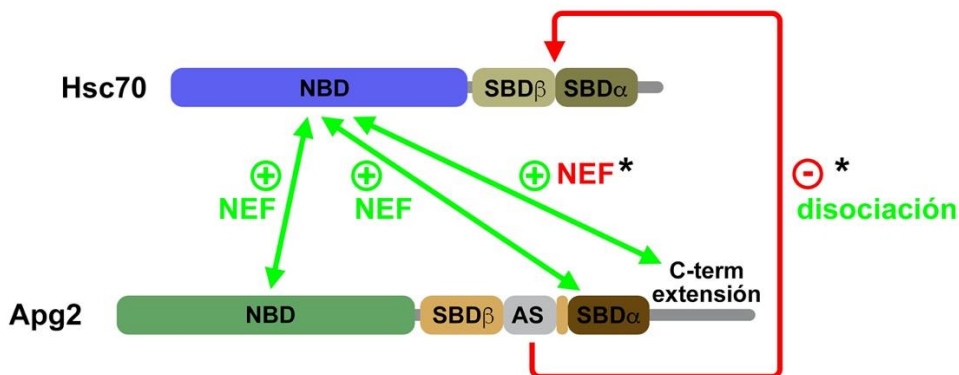


Figura 5.3: Interacciones entre los dominios de Hsc70 y Apg2. Representación esquemática de las interacciones entre los diferentes dominios de Hsc70 y Apg2 que son importantes para la formación del complejo y sus efectos funcionales. La contribución estabilizante de la interacción se denota por flechas y símbolos + verdes, mientras que la desestabilizantes por flechas y símbolos – rojos. Para los efectos funcionales (en texto), el color verde indica una estimulación mientras que el rojo una reducción. Los asteriscos denotan aquellas interacciones encontradas en esta Tesis.

En resumen, en esta Tesis hemos demostrado que Apg2 regula el ciclo conformacional de Hsc70 y estimula la reactivación de agregados proteicos, con unas propiedades compatibles con las de un NEF especializado. Este rol depende de los dominios divergentes de Apg2, el AS y la extensión C-terminal, que participan en la interacción con Hsc70, modificando la asociación/disociación del complejo entre las dos chaperonas y el intercambio de nucleótidos en Hsc70 (Figura 5.3).

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

1.- Apg2 potencia la actividad reactivadora de agregados proteicos de Hsc70 estimulando la unión de la chaperona a la superficie del agregado, mediante un mecanismo compatible con su actividad como intercambiador de nucleótidos.

2.- El subdominio ácido de Apg2 (AS) actúa como un interruptor molecular que desestabiliza el complejo con Hsc70 de modo que facilita su disociación y la progresión del ciclo funcional. Posiblemente el sitio de interacción se encuentra en el SBD de Hsc70.

3.- La extensión C-terminal de Apg2 interacciona con el NBD de Hsc70, aumentando significativamente la afinidad del complejo de una forma dependiente de la unión nucleótidos.

4.- La interacción de la extensión C-terminal de Apg2 con Hsc70 decelera el intercambio ADP/ATP en ésta, lo que amplía el rango de concentraciones en el que el sistema de chaperonas tiene actividad óptima.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Acebrón SP, Fernández-Sáiz V, Taneva SG, Moro F & Muga A (2008) DnaJ recruits DnaK to protein aggregates. *Journal of Biological Chemistry* 283, 1381-1390
- Acebrón SP, Martín I, del Castillo U, Moro F & Muga A (2009) DnaK-mediated association of ClpB to protein aggregates. A chaperone network at the aggregate surface. *FEBS Letters* 583, 2991-2996
- Aguado A, Fernández-Higuero JA, Cabrera Y, Moro F & Muga A (2015) ClpB dynamics is driven by its ATPase cycle and regulated by the DnaK system and substrate proteins. *Biochemical Journal* 466, 561-570
- Aguado A, Fernández-Higuero JA, Moro F & Muga A (2015) Chaperone-assisted protein aggregate reactivation: Different solutions for the same problem. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 580, 121-134
- Akimov V, Barrio-Hernandez I, Hansen SVF, Hallenborg P, Pedersen AK, Bekker-Jensen DB, Puglia M, Christensen SDK, Vanselow JT, Nielsen MM, *et al* (2018) Ubisite approach for comprehensive mapping of lysine and n-terminal ubiquitination sites. *Nature Structural and Molecular Biology* 25, 631-640
- Alvira S, Cuéllar J, Röhl A, Yamamoto S, Itoh H, Alfonso C, Rivas G, Buchner J & Valpuesta JM (2014) Structural characterization of the substrate transfer mechanism in Hsp70/Hsp90 folding machinery mediated by Hop. *Nature Communications* 5: 5484
- Andréasson C, Fiaux J, Rampelt H, Druffel-Augustin S & Bukau B (2008) Insights into the structural dynamics of the Hsp110-Hsp70 interaction reveal the mechanism for nucleotide exchange activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16519-16524
- Andréasson C, Fiaux J, Rampelt H, Mayer MP & Bukau B (2008) Hsp110 is a nucleotide-activated exchange factor for Hsp70. *Journal of Biological Chemistry* 283, 8877-8884
- Andréasson C, Rampelt H, Fiaux J, Druffel-Augustin S & Bukau B (2010) The endoplasmic reticulum Grp170 acts as a nucleotide exchange factor of Hsp70 via a mechanism similar to that of the cytosolic Hsp110. *Journal of Biological Chemistry* 285, 12445-12453
- Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230
- Anfinsen CB, Haber E, Sela M & White FH (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47, 1309-1314

Referencias

- Aprile FA, Dhulesia A, Stengel F, Roodveldt C, Benesch JLP, Tortora P, Robinson C v., Salvatella X, Dobson CM & Cremades N (2013) Hsp70 Oligomerization Is Mediated by an Interaction between the Interdomain Linker and the Substrate-Binding Domain. *PLoS ONE* 8: e67961
- Baaklini I, Wong MJH, Hantouche C, Patel Y, Shrier A & Young JC (2012) The DNAJA2 substrate release mechanism is essential for chaperone-mediated folding. *Journal of Biological Chemistry* 287, 41939-41954
- Bakthisaran R, Tangirala R & Rao CM (2015) Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1854, 291-319
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A & Kelly JW (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319, 916-919
- Barreto A, Gonzalez JM, Kabingu E, Asea A & Fiorentino S (2003) Stress-induced release of HSC70 from human tumors. *Cellular Immunology* 222, 97-104
- Bartlett AI & Radford SE (2009) An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nature Structural and Molecular Biology* 16, 582-588
- Baykov AA, Evtushenko OA & Avaeva SM (1988) A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Analytical Biochemistry* 171, 266-270
- Beckmann RP, Mizzen LA & Welch WJ (1990) Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science* 248, 850-854
- Benaroudj N, Fouchaq B & Ladjimi MM (1997) The COOH-terminal Peptide Binding Domain Is Essential for Self-association of the Molecular Chaperone HSC70. *Journal of Biological Chemistry* 272, 8744-8751
- Bennion BJ & Daggett V (2003) The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5142-5147
- Ben-Zvi A, de Los Rios P, Dietler G & Goloubinoff P (2004) Active solubilization and refolding of stable protein aggregates by cooperative unfolding action of individual Hsp70 chaperones. *Journal of Biological Chemistry* 279, 37298-37303
- Bertelsen EB, Chang L, Gestwicki JE & Zuiderweg (2009) ERP Solution conformation of wild-type E. coli Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 8471-8476

- Biebl MM & Buchner J (2019) Structure, function, and regulation of the hsp90 machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11: a034017
- Bigotti MG & Clarke AR (2008) Chaperonins: The hunt for the Group II mechanism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 474, 331-339
- Böcking T, Aguet F, Harrison SC & Kirchhausen T (2011) Single-molecule analysis of a molecular disassemblase reveals the mechanism of Hsc70-driven clathrin uncoating. *Nature Structural and Molecular Biology* 18, 295-302
- Böcking T, Aguet F, Rapoport I, Banzhaf M, Yu A, Zeeh JC & Kirchhausen T (2014) Key interactions for clathrin coat stability. *Structure* 22, 819-829
- Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J & Lindquist S (1989) hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Molecular and Cellular Biology* 9
- Bracher A & Verghese J (2015) The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2: 10
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254
- Brehmer D, Gässler C, Rist W, Mayer MP & Bukau B (2004) Influence of GrpE on DnaK-substrate interactions. *Journal of Biological Chemistry* 279, 27957–27964
- Brehmer D, Rüdiger S, Gässler CS, Klostermeier D, Packschies L, Reinstein J, Mayer MP & Bukau B (2001) Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nature Structural Biology* 8, 427-432
- Buczynski G, Slepnev S v., Sehorn MG & Witt SN (2001) Characterization of a lidless form of the molecular chaperone DnaK: Deletion of the lid increases peptide on- and off-rate constants. *Journal of Biological Chemistry* 276, 27231-27236
- Bukau B, Deuerling E, Pfund C & Craig EA (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101, 119-122
- Bukau B, Weissman J & Horwich A (2006) Molecular Chaperones and Protein Quality Control. *Cell* 125, 443-451

Referencias

- Bullock WO, Fernandez JM (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-379
- Carra S, Alberti S, Benesch JLP, Boelens W, Buchner J, Carver JA, Cecconi C, Ecroyd H, Gusev N, Hightower LE, *et al* (2019) Small heat shock proteins: multifaceted proteins with important implications for life. *Cell Stress and Chaperones*. 24, 295-308
- Celaya G, Fernández-Higuero JA, Martin I, Rivas G, Moro F & Muga A (2016) Crowding Modulates the Conformation, Affinity, and Activity of the Components of the Bacterial Disaggregase Machinery. *Journal of Molecular Biology* 428, 2474-2487
- Chari A (2019) Molecular chaperones biochemistry and role in neurodegenerative diseases. *International Journal of Biological Macromolecules* 131, 396-411
- Chang, L., *et al.* (2010) Mutagenesis reveals the complex relationships between ATPase rate and the chaperone activities of Escherichia coli heat shock protein 70 (Hsp70/DnaK). *Journal of Biological Chemistry* 285, 21282-21291.
- Chaudhuri TK, Verma VK & Maheshwari A (2009) GroEL assisted folding of large polypeptide substrates in Escherichia coli: Present scenario and assignments for the future. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 99, 42-50
- Chen B, Zhong D & Monteiro A (2006) Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* 7: 156
- Chen S & Smith DF (1998) Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. *Journal of Biological Chemistry* 273, 35194-35200
- Cheon M, Chang I, Mohanty S, Luheshi LM, Dobson CM, Vendruscolo M & Favrin G (2007) Structural reorganisation and potential toxicity of oligomeric species formed during the assembly of amyloid fibrils. *PLoS Computational Biology* 3, 1727-1738
- Chiappori F, Merelli I, Milanesi L, Colombo G & Morra G (2016) An atomistic view of Hsp70 allosteric crosstalk: From the nucleotide to the substrate binding domain and back. *Scientific Reports* 6: 23474
- Chirico WJ, Waters MG & Blobel G (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332, 805-810
- Chiti F & Dobson CM (2017) Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. *Annual Review of Biochemistry* 86, 27-68

- Ciechanover A (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: On protein death and cell life. *EMBO Journal* 17, 7151-7160
- Clerico EM, Meng W, Pozhidaeva A, Bhasne K, Petridis C & Gierasch LM (2019) Hsp70 molecular chaperones: Multifunctional allosteric holding and unfolding machines. *Biochemical Journal* 476, 1653-1677
- Cohen SN, Chang AC & Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, 2110-2114
- Compton SJ & Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry* 151, 369-374
- Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Höhfeld J & Patterson C (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nature Cell Biology* 3, 93-96
- Craig EA (2018) Hsp70 at the membrane: Driving protein translocation. *BMC Biology* 16: 11
- Craig EA & Marszalek J (2017) How Do J-Proteins Get Hsp70 to Do So Many Different Things? *Trends in Biochemical Sciences* 42, 355-368
- Dahiya V & Buchner J (2019) Functional principles and regulation of molecular chaperones. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 114, 1-60
- Daily MD & Gray JJ (2009) Allosteric communication occurs via networks of tertiary and quaternary motions in proteins. *PLoS Computational Biology* 5: e1000293
- Daugaard M, Rohde M & Jäättelä M (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters* 581, 3702-3710
- De Los Rios P, Ben-Zvi A, Slutsky O, Azem A & Goloubinoff P (2006) Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6166-6171
- Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA & Schekman R (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805

Referencias

- Diamant S, Peres Ben-Zvi A, Bukau B & Goloubinoff P (2000) Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. *Journal of Biological Chemistry* 275, 21107-21113
- Dikic I (2017) Proteasomal and autophagic degradation systems. *Annual Review of Biochemistry* 86, 103-224
- Dobson CM & Ellis RJ (1998) Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *The EMBO Journal* 17, 5251-5254
- Dobson CM, Swoboda BEP, Joniau M & Weissman C (2001) The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356
- Dollins DE, Warren JJ, Immormino RM & Gewirth DT (2007) Structures of GRP94-Nucleotide Complexes Reveal Mechanistic Differences between the hsp90 Chaperones. *Molecular Cell* 28, 41-56
- Doyle SM, Shorter J, Zolkiewski M, Hoskins JR, Lindquist S & Wickner S (2007) Asymmetric deceleration of ClpB or Hsp104 ATPase activity unleashes protein-remodeling activity. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 114-122
- Dragovic Z, Broadley SA, Shomura Y, Bracher A & Hartl FU (2006) Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO Journal* 25, 2519–2528
- Drozdetskiy A, Cole C, Procter J & Barton GJ (2015) JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research* 43, W389–W394
- Dublang L, Underhaug J, Flydal M, Velasco-Carneros L, Maréchal J, Moro F, Boyano M, Martinez A, Muga A (2021) Inhibition of the Human Hsc70 System by Small Ligands as a Potential Anticancer Approach. *Cancers* 13: 2936
- Duda JE, Giasson BI, Mabon ME, Miller DC, Golbe LI, Lee VMY & Trojanowski JQ (2002) Concurrence of α -synuclein and tau brain pathology in the Contursi kindred. *Acta Neuropathologica* 104, 7-11
- Easton DP, Kaneko Y & Subjeck JR (2000) The Hsp110 and Grp170 stress proteins: Newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress and Chaperones* 5, 276-290
- Eichner T, Kalverda AP, Thompson GS, Homans SW & Radford SE (2011) Conformational Conversion during Amyloid Formation at Atomic Resolution. *Molecular Cell* 41, 161-172

- Ellis J (1988) Proteins as molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry* 60, 321-347
- English CA, Sherman W, Meng W & Gierasch LM (2017) The Hsp70 interdomain linker is a dynamic switch that enables allosteric communication between two structured domains. *Journal of Biological Chemistry* 292, 14765-14774
- Erlejman AG, Lagadari M, Toneatto J, Piwien-Pilipuk G & Galigniana MD (2014) Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1839, 71-87
- Eroglu B, Moskophidis D & Mivechi NF (2010) Loss of Hsp110 Leads to Age-Dependent Tau Hyperphosphorylation and Early Accumulation of Insoluble Amyloid β . *Molecular and Cellular Biology* 30, 4626-4643
- Escusa-Toret S, Vonk WIM & Frydman J (2013) Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress. *Nature Cell Biology* 15, 1231-1243
- Evans CG, Chang L & Gestwicki JE (2010) Heat shock protein 70 (Hsp70) as an emerging drug target. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 4585-4602
- Fan CY, Lee S, Ren HY & Cyr DM (2004) Exchangeable Chaperone Modules Contribute to Specification of Type I and Type II Hsp40 Cellular Function. *Molecular Biology of the Cell* 15, 761-773
- Fan CY, Ren HY, Lee P, Caplan AJ & Cyr DM (2005) The type I Hsp40 zinc finger-like region is required for Hsp70 to capture non-native polypeptides from Ydj. *Journal of Biological Chemistry* 280, 695-702
- Fan Q, Park KW, Du Z, Morano KA & Li L (2007) The role of Sse1 in the de novo formation and variant determination of the [PSI⁺] prion. *Genetics* 177, 1583-1593
- Faust O, Abayev-Avraham M, Wentink AS, Maurer M, Nillegoda NB, London N, Bukau B & Rosenzweig R (2020) HSP40 proteins use class-specific regulation to drive HSP70 functional diversity. *Nature* 587, 489-494
- Fei X, Ye X, LaRonde NA & Lorimer GH (2014) Formation and structures of GroEL:GroES2 chaperonin footballs, the protein-folding functional form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 12775-12780

Referencias

- Fernández-Fernández MR, Gragera M, Ochoa-Ibarrola L, Quintana-Gallardo L & Valpuesta JM (2017) Hsp70 – a master regulator in protein degradation. *FEBS Letters* 591, 2648-2660
- Fernández-Higuero JA, Aguado A, Perales-Calvo J, Moro F & Muga A (2018) Activation of the DnaK-ClpB Complex is Regulated by the Properties of the Bound Substrate. *Scientific Reports* 8: 5796
- Fernández-Higuero JA, Muga A & Vilar JMG (2020) Extraction and Refolding Determinants of Chaperone-Driven Aggregated Protein Reactivation. *Journal of Molecular Biology* 432, 3239-3250
- Fernández-Sáiz V, Moro F, Arizmendi JM, Acebrón SP & Muga A (2006) Ionic contacts at DnaK substrate binding domain involved in the allosteric regulation of lid dynamics. *Journal of Biological Chemistry* 281, 7479-7488
- Fersht AR (2000) Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: Contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1525-1529
- Finka A, Sharma SK & Goloubinoff P (2015) Multi-layered molecular mechanisms of polypeptide holding, unfolding and disaggregation by HSP70/HSP110 chaperones. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2: 29
- Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C & McKay DB (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 346, 623-628
- Florin L, Becker KA, Sapp C, Lambert C, Sirma H, Müller M, Streeck RE & Sapp M (2004) Nuclear Translocation of Papillomavirus Minor Capsid Protein L2 Requires Hsc70. *Journal of Virology* 78, 5546-5553
- Fourie AM, Sambrookl JF, Gething MH (1994) Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry* 269, 30470-30478
- Fourieso AM, Sambrookl JF & Gethingson M-JH (1994) Common and Divergent Peptide Binding Specificities of hsp70 Molecular Chaperones. *Journal of Biological Chemistry* 269, 30470-30478
- Frydman J (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry* 70, 603-647
- Frydman J & Hartl FU (1996) Principles of chaperone-assisted protein folding: Differences between in vitro and in vivo mechanisms. *Science* 272, 1497-1502

- Fu X (2014) Chaperone function and mechanism of small heat-shock proteins. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 46, 347-356
- Gao X, Carroni M, Nussbaum-Krammer C, Mogk A, Nillegoda NB, Szlachcic A, Guilbride DL, Saibil HR, Mayer MP & Bukau B (2015) Human Hsp70 Disaggregase Reverses Parkinson's-Linked α -Synuclein Amyloid Fibrils. *Molecular Cell* 59, 781-793
- Garcia VM, Nillegoda NB, Bukau B & Morano KA (2017) Substrate binding by the yeast Hsp110 nucleotide exchange factor and molecular chaperone Sse1 is not obligate for its biological activities. *Molecular Biology of the Cell* 28, 2066-2075
- Garrido C, Paul C, Seigneuric R & Kampinga HH (2012) The small heat shock proteins family: The long forgotten chaperones. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44, 1588-1592
- Gässler CS, Wiederkehr T, Brehmer D, Bukau B & Mayer MP (2001) Bag-1M Accelerates Nucleotide Release for Human Hsc70 and Hsp70 and Can Act Concentration-dependent as Positive and Negative Cofactor. *Journal of Biological Chemistry* 276, 32538-32544
- Gates SN, Yokom AL, Lin JB, Jackrel ME, Rizo AN, Kendsersky NM, Buell CE, Sweeny EA, Mack KL, Chuang E, *et al* (2017) Ratchet-like polypeptide translocation mechanism of the AAA+ disaggregase Hsp104. *Science* 357, 273-279
- Gautschi M, Lilie H, Fünfschilling U, Mun A, Ross S, Lithgow T, Rücknagel P & Rospert S (2001) RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zutin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3762-3767
- General IJ, Liu Y, Blackburn ME, Mao W, Gierasch LM & Bahar I (2014) ATPase Subdomain IA Is a Mediator of Interdomain Allostery in Hsp70 Molecular Chaperones. *PLoS Computational Biology* 10: e1003624
- Goeckeler JL, Petruso AP, Aguirre J, Clement CC, Chiosis G & Brodsky JL (2008) The yeast Hsp110, Sse1p, exhibits high-affinity peptide binding. *FEBS Letters* 582, 2393-2396
- Goeckeler JL, Stephens A, Lee P, Caplan AJ & Brodsky JL (2002) Overexpression of Yeast Hsp110 Homolog Sse1p Suppresses ydj1-151 Thermosensitivity and Restores Hsp90-dependent Activity. *Molecular Biology of the Cell* 13, 2760-2770
- Goloubinoff P & Rios PDL (2007) The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. *Trends in Biochemical Sciences* 32, 372-380
- Goodsell DS (1991) Inside a living cell. *Trends in Biochemical Sciences* 16, 203-206

Referencias

- Goto Y, Calciano LJ & Fink AL (1990) Acid-induced folding of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 573-577
- Grant SGN, Jesseet J, Bloomt FR & Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants (bacterial restriction/DNA methylation/cloning mammalian DNA/heterogeneous transgene expression/insulin gene regulation). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4645-4649
- Hageman J, van Waarde-Verhagen M, Zylicz A, Walerych D & Kampinga HH (2011) The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities. *Bio-chemical Journal* 435, 127-142
- Harrison CJ, Manajit H-H, di Liberto M, Ulrich-Hartl F & Kuriyan J (1997) Crystal Structure of the Nucleotide Exchange Factor GrpE Bound to the ATPase Domain of the Molecular Chaperone DnaK. *Science* 276, 431-435
- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-580
- Hartl FU, Bracher A & Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324-332
- Hartl FU & Hayer-Hartl M (2002) Protein folding. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858
- Haslbeck M, Miess A, Stromer T, Walter S & Buchner J (2005) Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol: The cooperation of HSP26 with SSA1 and HSP104. *Journal of Biological Chemistry* 280, 23861-23868
- Haslbeck M & Vierling E (2015) A first line of stress defense: Small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of Molecular Biology* 427, 1537-1548
- Haslberger T, Weibezahn J, Zahn R, Lee S, Tsai FTF, Bukau B & Mogk A (2007) M Domains Couple the ClpB Threading Motor with the DnaK Chaperone Activity. *Molecular Cell* 25, 247-260
- Haslberger T, Zdanowicz A, Brand I, Kirstein J, Turgay K, Mogk A & Bukau B (2008) Protein disaggregation by the AAA+ chaperone ClpB involves partial threading of looped polypeptide segments. *Nature Structural and Molecular Biology* 15, 641-650
- Hipp MS, Kasturi P & Hartl FU (2019) The proteostasis network and its decline in ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20, 421-435

- Hipp MS, Park SH & Hartl UU (2014) Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends in Cell Biology* 24, 506-514
- Hjerpe R, Bett JS, Keuss MJ, Solovyova A, McWilliams TG, Johnson C, Sahu I, Varghese J, Wood N, Wightman M, *et al* (2016) UBQLN2 Mediates Autophagy-Independent Protein Aggregate Clearance by the Proteasome. *Cell* 166, 935-949
- Höhfeld J, Cyr DM & Patterson C (2001) From the cradle to the grave: Molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Reports* 2, 885-890
- Horwich AL, Fenton WA, Chapman E & Farr GW (2007) Two families of chaperonin: Physiology and mechanism. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23, 115-145
- Huo Y, Hu Z, Zhang K, Wang L, Zhai Y, Zhou Q, Lander G, Zhu J, He Y, Pang X, *et al* (2010) Crystal structure of group II chaperonin in the open state. *Structure* 18, 1270-1279
- Jaattela M, Wissing D, Bauer PA & Li GC (1992) Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO Journal* 11, 3507-3512
- Jackson SE & Fersht AR (1991) Folding of Chymotrypsin Inhibitor 2.1. Evidence for a Two-State Transition. *Biochemistry* 30, 10428-10435
- Jahn TR & Radford SE (2005) The Yin and Yang of protein folding. *FEBS Journal* 272, 5962-5970
- Jakob U, Gaestel M, Engel K & Buchner J (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry* 268, 1517-1520
- Jana NR, Tanaka M, Wang GH & Nukina N (2000) Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: Their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Human Molecular Genetics* 9, 2009-2018
- Jiang J, Maes EG, Taylor AB, Wang L, Hinck AP, Lafer EM & Sousa R (2007) Structural Basis of J Cochaperone Binding and Regulation of Hsp70. *Molecular Cell* 28, 422-433
- Kakkar V, Meister-Broekema M, Minoia M, Carra S & Kampinga HH (2014) Barcoding heat shock proteins to human diseases: Looking beyond the heat shock response. *DMM Disease Models and Mechanisms* 7, 421-434

Referencias

- Kampinga HH, Andreasson C, Barducci A, Cheetham ME, Cyr D, Emanuelsson C, Genevaux P, Gestwicki JE, Goloubinoff P, Huerta-Cepas J, *et al* (2019) Function, evolution, and structure of J-domain proteins. *Cell Stress and Chaperones* 24, 7-15
- Kampinga HH, Brunsting JF, Stege GJJ, Konings AWT & Landry J (1994) Cells overexpressing Hsp27 show accelerated recovery from heat-induced nuclear protein aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 204, 1170-1177
- Kampinga HH & Craig EA (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 579-592
- Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B & Hightower LE (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* 14, 105-111
- Kaneko Y, Kimura T, Nishiyama H, Noda Y & Fujita J (1997) Developmentally regulated expression of APG-1, a member of heat shock protein 110 family in murine male germ cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 233, 113-116
- Kaneko Y, Nishiyama H, Nonoguchi K, Higashitsuji H, Kishishita M & Fujita J (1997) A novel hsp110-related gene, apg-1, that is abundantly expressed in the testis responds to a low temperature heat shock rather than the traditional elevated temperatures. *Journal of Biological Chemistry* 272, 2640-2645
- Kim KK, Hung LW, Yokota H, Kim R & Kim SH (1998) Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10419-10424
- Kim SY, Miller EJ, Frydman J & Moerner WE (2010) Action of the chaperonin GroEL/ES on a non-native substrate observed with single-molecule FRET. *Journal of Molecular Biology* 401, 553-563
- Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M & Ulrich Hartl F (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry* 82, 323-355
- Kirstein J, Arnsburg K, Scior A, Szlachcic A, Guilbride DL, Morimoto RI, Bukau B & Nillegoda NB (2017) In vivo properties of the disaggregase function of J-proteins and Hsc70 in *Caenorhabditis elegans* stress and aging. *Aging Cell* 16, 1414-1424

- Kirstein J, Molière N, Dougan DA & Turgay K (2009) Adapting the machine: Adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nature Reviews Microbiology* 7, 589-599
- Kityk R, Kopp J & Mayer MP (2018) Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones. *Molecular Cell* 69, 227-237
- Kityk R, Kopp J, Sinning I & Mayer MP (2012) Structure and Dynamics of the ATP-Bound Open Conformation of Hsp70 Chaperones. *Molecular Cell* 48, 863-874
- Kityk R, Vogel M, Schlecht R, Bukau B & Mayer MP (2015) Pathways of allosteric regulation in Hsp70 chaperones. *Nature Communications* 6: 8308
- Kleizen B & Braakman I (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 43-349
- Kopito RR & Sitia R (2000) Aggresomes and Russell bodies - Symptoms of cellular indigestion? *EMBO Reports* 1, 225-231
- Kriehuber T, Rattei T, Weinmaier T, Bepperling A, Haslbeck M & Buchner J (2010) Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB Journal* 24, 3633-3642
- Kryndushkin D & Wickner RB (2007) Nucleotide exchange factors for Hsp70s are required for [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 18, 2149-2154
- Kumar A & Biswas P (2019) Effect of Correlated Pair Mutations in Protein Misfolding. *Journal of Physical Chemistry B* 123, 5069-5078
- Labbadia J & Morimoto RI (2015) The biology of proteostasis in aging and disease. *Annual Review of Biochemistry* 84, 435-464
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lai AL, Clerico EM, Blackburn ME, Patel NA, Robinson C v., Borbat PP, Freed JH & Gierasch LM (2017) Key features of an Hsp70 chaperone allosteric landscape revealed by ion-mobility native mass spectrometry and double electron-electron resonance. *Journal of Biological Chemistry* 292, 8773-8785
- Laskey RA, Honda BM, Mills AD & Finch JT (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275, 416-420

Referencias

- Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Mogk A, Reinstein J & Bukau B (1999) Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5452-5457
- Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW & Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-B oligomers. *Nature* 457, 1128-1132
- Lawrence AM & Besir H (2009) Staining of proteins in gels with Coomassie G-250 without organic solvent and acetic acid. *Journal of Visualized Experiments* 30
- Lee S, Fan CY, Michael Younger J & Ren H (2002) Identification of essential residues in the type II Hsp40 Sis1 that function in polypeptide binding. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21675-21682
- Lee S, Sowa ME, Choi JM & Tsai FTF (2004) The ClpB/Hsp104 molecular chaperone - A protein disaggregating machine. *Journal of Structural Biology* 146, 99-105
- Lee-Yoon D, Easton D, Murawski M, Burd R & Subject JR (1995) Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry* 270, 15725-15733
- Levinthal C (1968) Are there pathways for protein folding? *Journal de Chimie Physique* 65, 44-45
- Liberek K, Lewandowska A & Ziętkiewicz S (2008) Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO Journal* 27, 328-335
- Li GC, Li L, Liu YK, Mak JY, Chen L & Lee WMF (1991) Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1681-1685
- Li J, Qian X & Sha B (2003) The Crystal Structure of the Yeast Hsp40 Ydj1 Complexed with Its Peptide Substrate. *Structure* 11, 1475-1483
- Linke K, Wolfram T, Bussemer J & Jakob U (2003) The Roles of the Two Zinc Binding Sites in DnaJ. *Journal of Biological Chemistry* 278, 44457-44466
- Liu Q & Hendrickson WA (2007) Insights into Hsp70 Chaperone Activity from a Crystal Structure of the Yeast Hsp110 Sse1. *Cell* 131, 106-120

- Liu T, Daniels CK & Cao S (2012) Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacology and Therapeutics* 136, 354-374
- Lu K, Psakhye I & Jentsch S (2014) Autophagic clearance of PolyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family. *Cell* 158, 549-563
- Lum R, Tkach JM, Vierling E & Glover JR (2004) Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104. *Journal of Biological Chemistry* 279, 29139-29146
- Makhnevych T, Wong P, Pogoutse O, Vizeacoumar FJ, Greenblatt JF, Emili A & Houry WA (2012) Hsp110 is required for spindle length control. *Journal of Cell Biology* 198, 623-636
- Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD & Butt TR (2004) SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Journal of Structural and Functional Genomics* 5, 75-86
- Mamiatis T, Fritsch EF, Sambrook J & Engel J (1985) Molecular cloning-A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982, 545 S., 42 \$. *Acta Biotechnologica* 5, 104-104
- Mandal AK, Gibney PA, Nillegoda NB, Theodoraki MA, Caplan AJ & Morano KA (2010) Hsp110 Chaperones Control Client Fate Determination in the Hsp70-Hsp90 Chaperone System. *Molecular Biology of the Cell* 21, 1439-1448
- Marchenkov V v. & Semisotnov G v. (2009) GroEL-assisted protein folding: Does it occur within the chaperonin inner cavity? *International Journal of Molecular Sciences* 10, 2066-2083
- Martin I, Celaya G, Alfonso C, Moro F, Rivas G, Muga A (2014) Crowding activates ClpB and enhances its association with DnaK for efficient protein aggregate reactivation. *Biophysical Journal* 106, 2017-2027.
- Matsumori M, Itoh H, Toyoshima I, Komatsuda A, Sawada KI, Fukuda J, Tanaka T, Okubo A, Kinouchi H, Mizoi K, *et al* (2002) Characterization of the 105-kDa molecular chaperone. Identification, biochemical properties, and localization. *European Journal of Biochemistry* 269, 5632-5641
- Mattoo RUH, Sharma SK, Priya S, Finka A & Goloubinoff P (2013) Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates. *Journal of Biological Chemistry* 288, 21399-21411

Referencias

- Mayer MP (2010) Gymnastics of molecular chaperones. *Molecular Cell* 39, 321-331
- Mayer MP & Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 670-684
- Mayer MP & Gierasch LM (2019) Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry* 294, 2085-2097
- Mayer MP & Kityk R (2015) Insights into the molecular mechanism of allostery in Hsp70s. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2: 58
- Mayer MP, Schröder H, Rüdiger S, Paal K, Laufen T & Bukau B (2000) Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nature Structural Biology* 7, 586-593
- Meacham GC, Lu Z, King S, Sorscher E, Tousson A & Cyr DM (1999) The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO Journal* 18, 1492-1505
- Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM & Cyr DM (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nature Cell Biology* 3,100-105
- Meimaridou E, Gooljar SB & Chapple JP (2009) From hatching to dispatching: The multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery. *Journal of Molecular Endocrinology* 42, 1-9
- Meng W, Clerico EM, McArthur N & Gierasch LM (2018) Allosteric landscapes of eukaryotic cytoplasmic Hsp70s are shaped by evolutionary tuning of key interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 11970-11975
- Meyer P, Prodromou C, Liao C, Hu B, Roe SM, Vaughan CK, Vlasic I, Panaretou B, Piper PW & Pear LH (2004) Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO Journal* 23, 511-519
- Michels AA, Kanon B, Konings AWT, Ohtsuka K, Bensaude O & Kampinga HH (1997) Hsp70 and Hsp40 chaperone activities in the cytoplasm and the nucleus of mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 33283-33289
- Mickler M, Hessling M, Ratzke C, Buchner J & Hugel T (2009) The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. *Nature Structural and Molecular Biology* 16, 281-286

- Minton AP (2005) Influence of macromolecular crowding upon the stability and state of association of proteins: Predictions and observations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 1668-1675
- Miot M, Reidy M, Doyle SM, Hoskins JR, Johnston DM, Genest O, Vitery M-C, Masison DC & Wickner S (2011) Species-specific collaboration of heat shock proteins (Hsp) 70 and 100 in thermotolerance and protein disaggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 6915-6920
- Misselwitz B, Staeck O & Rapoport TA (1998) J Proteins Catalytically Activate Hsp70 Molecules to Trap a Wide Range of Peptide Sequences. *Molecular Cell* 2, 593-603
- Mogk A, Bukau B & Kampinga HH (2018) Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. *Molecular Cell* 69, 214-226
- Mogk A, Deuerling E, Vorderwülbecke S, Vierling E & Bukau B (2003) Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Molecular Microbiology* 50, 585-595
- Mogk A, Schlieker C, Friedrich KL, Schönfeld HJ, Vierling E & Bukau B (2003) Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *Journal of Biological Chemistry* 278, 31033-31042
- Mogk A, Tomoyasu T, Goloubinoff P, Rü S, Rö Der D, Langen H & Bukau B (1999) Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *The EMBO Journal* 18, 6934-6949
- Mok SA, Condello C, Freilich R, Gillies A, Arhar T, Oroz J, Kadavath H, Julien O, Assimon VA, Rauch JN, *et al* (2018) Mapping interactions with the chaperone network reveals factors that protect against tau aggregation. *Nature Structural and Molecular Biology* 25, 384-393
- Moran L, Mirault ME, Arrigo AP, Goldschmidt-Clermont M & Tissières A (1978) Heat shock of Drosophila melanogaster induces the synthesis of new messenger RNAs and proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 283: 997
- Morimoto RI (2008) Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes and Development* 22, 1427-1438
- Moro F, Fernández-Sáiz V & Muga A (2004) The Lid Subdomain of DnaK Is Required for the Stabilization of the Substrate-binding Site. *Journal of Biological Chemistry* 279, 19600-19606

Referencias

- Moro F, Fernández-Sáiz V, Slutsky O, Azem A & Muga A (2005) Conformational properties of bacterial DnaK and yeast mitochondrial Hsp70: Role of the divergent C-terminal α -helical subdomain. *FEBS Journal* 272, 3184-3196
- Moro F & Muga A (2006) Thermal Adaptation of the Yeast Mitochondrial Hsp70 System is Regulated by the Reversible Unfolding of its Nucleotide Exchange Factor. *Journal of Molecular Biology* 358, 1367-1377
- Moro F, Okamoto K, Donzeau M, Neupert W & Brunner M (2002) Mitochondrial protein import: Molecular basis of the ATP-dependent interaction of MtHsp70 with Tim44. *Journal of Biological Chemistry* 277, 6874-6880
- Moro F, Taneva SG, Velázquez-Campoy A & Muga A (2007) GrpE N-terminal Domain Contributes to the Interaction with DnaK and Modulates the Dynamics of the Chaperone Substrate Binding Domain. *Journal of Molecular Biology* 374, 1054-1064
- Muchowski PJ (2002) Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: A critical role for molecular chaperones? *Neuron* 35, 9-12
- Muñoz IG, Yébenes H, Zhou M, Mesa P, Serna M, Park AY, Bragado-Nilsson E, Beloso A, de Cárcer G, Malumbres M, *et al* (2011) Crystal structure of the open conformation of the mammalian chaperonin CCT in complex with tubulin. *Nature Structural and Molecular Biology* 18, 14-19
- Mymrikov E v., Seit-Nebi AS & Gusev NB (2011) Large potentials of small heat shock Proteins. *Physiological Reviews* 91, 1123-1159,
- Nicolai A, Delarue P & Senet P (2013) Decipher the Mechanisms of Protein Conformational Changes Induced by Nucleotide Binding through Free-Energy Landscape Analysis: ATP Binding to Hsp70. *PLoS Computational Biology* 9: e1003379
- Nillegoda NB & Bukau B (2015) Metazoan Hsp70-based protein disaggregases: Emergence and mechanisms. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2: 57
- Nillegoda NB, Kirstein J, Szlachcic A, Berynskyy M, Stank A, Stengel F, Arnsburg K, Gao X, Scior A, Aebersold R, *et al* (2015) Crucial HSP70 co-chaperone complex unlocks metazoan protein disaggregation. *Nature* 524, 247-251
- Nillegoda NB, Stank A, Malinverni D, Alberts N, Szlachcic A, Barducci A, de Los Rios P, Wade RC & Bukau B (2017) Evolution of an intricate J-protein network driving protein disaggregation in eukaryotes. *Biochemistry and Chemical Biology* 6: e24560

- Nirdé P, Derocq D, Maynadier M, Chambon M, Basile I, Gary-Bobo M & Garcia M (2010) Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells. *Oncogene* 29, 117-127
- Nollen EAA, Brunsting JF, Roelofsen H, Weber LA & Kampinga HH (1999) In Vivo Chaperone Activity of Heat Shock Protein 70 and Thermotolerance. *Molecular and Cellular Biology* 19, 2069-2079
- Nørby JG (1988) Coupled Assay of Na⁺,K⁺-ATPase Activity. *Methods in Enzymology* 156, 116-119
- Novy R, Drott D, Yaeger K & Mierendorf R (2001) Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression. *inNovations* 12, 1-3
- Oh HJ, Chen X & Subject JR (1997) hsp110 Protects Heat-denatured Proteins and Confers Cellular Thermoresistance. *Journal of Biological Chemistry* 272, 31636-31640
- Oh HJ, Easton D, Murawski M, Kaneko Y & Subject JR (1999) The Chaperoning Activity of hsp110 IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL DOMAINS BY USE OF TARGETED DELETIONS. *Journal of Biological Chemistry* 274, 15712-15718
- Packschies L, Theyssen H, Buchberger A, Bukau B, Goody RS & Reinstein J (1997) Accelerated Publications GrpE Accelerates Nucleotide Exchange of the Molecular Chaperone DnaK with an Associative Displacement Mechanism. *Biochemistry* 36, 3417-3422
- Pelham HR (1984) Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *The EMBO journal* 3, 3095-3100
- Penney JB, Vonsattel JP, MacDonald ME, Gusella JF & Myers RH (1997) CAG repeat number governs the development rate of pathology in huntington's disease. *Annals of Neurology* 41, 689-692
- Perales-Calvo J, Muga A & Moro F (2010) Role of DnaJ G/F-rich domain in conformational recognition and binding of protein substrates. *Journal of Biological Chemistry* 285, 34231-34239
- Polier S, Dragovic Z, Hartl FU & Bracher A (2008) Structural Basis for the Cooperation of Hsp70 and Hsp110 Chaperones in Protein Folding. *Cell* 133, 1068-1079
- Ponomarev MA, Timofeev VP & Levitskiy DI (1995) The difference between ADP-beryllium fluoride and ADP-aluminium fluoride complexes of the spin-labeled myosin subfragment 1. *FEBS Letters* 371, 261-263

Referencias

- Powers ET & Balch WE (2013) Diversity in the origins of proteostasis networks—a driver for protein function in evolution. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 237-248
- Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW & Balch WE (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annual Review of Biochemistry* 78, 959-991
- Queitsch C, Hong S-W, Vierling E & Lindquist S (2000) Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell* 12, 479-492
- Rampelt H, Kirstein-Miles J, Nillegoda NB, Chi K, Scholz SR, Morimoto RI & Bukau B (2012) Metazoan Hsp70 machines use Hsp110 to power protein disaggregation. *EMBO Journal* 31, 4221-4235
- Ratzke C, Mickler M, Hellenkamp B, Buchner J & Hugel T (2010) Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 16101-16106
- Rauch JN & Gestwicki JE (2014) Binding of human nucleotide exchange factors to heat shock protein 70 (Hsp70) generates functionally distinct complexes in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 289, 1402-1414
- Raviol H, Bukau B & Mayer MP (2006) Human and yeast Hsp110 chaperones exhibit functional differences. *FEBS Letters* 580, 168-174
- Raviol H, Sadlish H, Rodriguez F, Mayer MP & Bukau B (2006) Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *EMBO Journal* 25, 2510-2518
- Reidy M, Sharma R, Shastry S, Roberts BL, Albino-Flores I, Wickner S & Masison DC (2014) Hsp40s Specify Functions of Hsp104 and Hsp90 Protein Chaperone Machines. *PLoS Genetics* 10: e1004720
- Rg J, Hfeld H & Zmbh SJ (1997) GrpE-like regulation of the Hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *The EMBO Journal* 16, 6209-6216
- Rizo AN, Lin JB, Gates SN, Tse E, Bart SM, Castellano LM, DiMaio F, Shorter J & Southworth DR (2019) Structural basis for substrate gripping and translocation by the ClpB AAA+ disaggregase. *Nature Communications* 10: 2393
- Rodriguez F, Arsène-Ploetze F, Rist W, Rüdiger S, Schneider-Mergener J, Mayer MP & Bukau B (2008) Molecular Basis for Regulation of the Heat Shock Transcription Factor σ 32 by the DnaK and DnaJ Chaperones. *Molecular Cell* 32, 347-358

- Röhl A, Rohrberg J & Buchner J (2013) The chaperone Hsp90: Changing partners for demanding clients. *Trends in Biochemical Sciences* 38, 253-262
- Roh SH, Kasembeli M, Bakthavatsalam D, Chiu W & Tweardy DJ (2015) Contribution of the type II chaperonin, TRiC/CCT, to oncogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 26706-26720
- Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP *et al.* (2019) The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 20, 665–680
- Ryabova NA, Marchenkov V v., Marchenkova SY, Kotova N v. & Semisotnov G v. (2013) Molecular chaperone GroEL/ES: Unfolding and refolding processes. *Biochemistry (Moscow)* 78, 1405-1414
- Sabate R, de Groot NS & Ventura S (2010) Protein folding and aggregation in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 2695-2715
- Sadlish H, Rampelt H, Shorter J, Wegrzyn RD, Andréasson C, Lindquist S & Bukau B (2008) Hsp110 chaperones regulate prion formation and propagation in *S. cerevisiae* by two discrete activities. *PLoS ONE* 3: e1763
- Sahlan M, Zako T & Yohda M (2018) Prefoldin, a jellyfish-like molecular chaperone: functional cooperation with a group II chaperonin and beyond. *Biophysical Reviews* 10, 339-345
- Saibil HR, Fenton WA, Clare DK & Horwich AL (2013) Structure and allostery of the chaperonin GroEL. *Journal of Molecular Biology* 425, 1476-1487
- Saito Y, Yamagishi N & Hatayama T (2007) Different localization of Hsp105 family proteins in mammalian cells. *Experimental Cell Research* 313, 3707-3717
- Saito Y, Yamagishi N & Hatayama T (2009) Nuclear localization mechanism of Hsp105 β and its possible function in mammalian cells. *Journal of Biochemistry* 145, 185-191
- Sánchez Y & Lindquist SL (1990) HSP104 Required for Induced Thermotolerance. *Science* 248, 1112-1115
- Saxena A, Banasavadi-Siddegowda YK, Fan Y, Bhattacharya S, Roy G, Giovannucci DR, Frizzell RA & Wang X (2012) Human heat shock protein 105/110 kDa (Hsp105/110) regulates biogenesis and quality control of misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at multiple levels. *Journal of Biological Chemistry* 287, 19158-19170

Referencias

- Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU & Moarefi I (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101, 199-210
- Schlecht R, Erbse AH, Bukau B & Mayer MP (2011) Mechanics of Hsp70 chaperones enables differential interaction with client proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* 18, 345-351
- Schlossman DM, Schmid SL, Braell WA & Rothman JE (1984) An enzyme that removes clathrin coats: Purification of an uncoating ATPase. *Journal of Cell Biology* 99, 723-733
- Schuermann JP, Jiang J, Cuellar J, Llorca O, Wang L, Gimenez LE, Jin S, Taylor AB, Demeler B, Morano KA, *et al* (2008) Structure of the Hsp110:Hsc70 Nucleotide Exchange Machine. *Molecular Cell* 31, 232-243
- Scior A, Buntru A, Arnsburg K, Ast A, Iburg M, Juenemann K, Pigazzini ML, Mlody B, Puchkov D, Priller J, *et al* (2018) Complete suppression of Htt fibrilization and disaggregation of Htt fibrils by a trimeric chaperone complex. *The EMBO Journal* 37, 282-299
- Shaner L, Sousa R & Morano KA (2006) Characterization of Hsp70 binding and nucleotide exchange by the yeast Hsp110 chaperone Sse1. *Biochemistry* 45, 15075-15084
- Shaner L, Trott A, Goeckeler JL, Brodsky JL & Morano KA (2004) The function of the yeast molecular chaperone Sse1 is mechanistically distinct from the closely related Hsp70 family. *Journal of Biological Chemistry* 279, 21992-22001
- Shaner L, Wegele H, Buchner J & Morano KA (2005) The yeast Hsp110 Sse1 functionally interacts with the Hsp70 chaperones Ssa and Ssb. *Journal of Biological Chemistry* 280, 41262-41269
- Sharma SK, de Los Rios P, Christen P, Lustig A & Goloubinoff P (2010) The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. *Nature Chemical Biology* 6, 914-920
- Shiau AK, Harris SF, Southworth DR & Agard DA (2006) Structural Analysis of E. coli hsp90 Reveals Dramatic Nucleotide-Dependent Conformational Rearrangements. *Cell* 127, 329-340
- Shomura Y, Dragovic Z, Chang HC, Tzvetkov N, Young JC, Brodsky JL, Guerriero V, Hartl FU & Bracher A (2005) Regulation of Hsp70 function by HspBP1: Structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Molecular Cell* 17, 367-379

- Shorter J (2011) The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. *PLoS ONE* 6: e26319
- Sielaff B & Tsai FTF (2010) The M-Domain Controls Hsp104 Protein Remodeling Activity in an Hsp70/Hsp40-Dependent Manner. *Journal of Molecular Biology* 402, 30-37
- Sinha N & Nussinov R (2001) Point mutations and sequence variability in proteins: Redistributions of preexisting populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3139-3144
- Smock RG, Rivoire O, Russ WP, Swain JF, Leibler S, Ranganathan R & Gierasch LM (2010) An interdomain sector mediating allostery in Hsp70 molecular chaperones. *Molecular Systems Biology* 6: 414
- Sondermann H, Scheufler C, Schneider C, Höhfeld J, Hartl FU & Moarefi I (2001) Structure of a Bag/Hsc70 complex: Convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science* 291, 1553-1557
- Song Y, Nagy M, Ni W, Tyagi NK, Fenton WA, López-Giráldez F, Overton JD, Horwich AL & Brady ST (2013) Molecular chaperone Hsp110 rescues a vesicle transport defect produced by an ALS-associated mutant SOD1 protein in squid axoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 5428-5433
- Sousa R (2014) Structural mechanisms of chaperone mediated protein disaggregation. *Frontiers in Molecular Biosciences* 1: 12
- Sousa R & Lafer EM (2019) The physics of entropic pulling: A novel model for the Hsp70 motor mechanism. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 2334
- Sousa R, Liao HS, Cuéllar J, Jin S, Valpuesta JM, Jin AJ & Lafer EM (2016) Clathrin-coat disassembly illuminates the mechanisms of Hsp70 force generation. *Nature Structural and Molecular Biology* 23, 821-829
- Specht S, Miller SBM, Mogk A & Bukau B (2011) Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 195, 617-629
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M & Goedert M (1998) α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6469-6473

Referencias

- Squires CL, Pedersen S, Ross BM & Squires C (1991) C1pB Is the Escherichia coli Heat Shock Protein. *Journal of Bacteriology* 173, 4254-4262
- Stadtman ER & Levine RL (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207-218
- Steel GJ, Fullerton DM, Tyson JR & Stirling CJ (2004) Coordinated Activation of Hsp70 Chaperones. *Science* 303, 98-101
- Stetz G & Verkhivker GM (2015) Dancing through life: Molecular dynamics simulations and network-centric modeling of allosteric mechanisms in Hsp70 and Hsp110 chaperone proteins. *PLoS ONE* 10: e0143752
- Stillman BW, Topp WC & Engler JA (1982) Conserved Sequences at the Origin of Adenovirus DNA Replication. *Journal of Virology* 44, 530-537
- Stricher F, Macri C, Ruff M & Muller S (2013) HSPA8/HSC70 chaperone protein: Structure, function, and chemical targeting. *Autophagy* 9, 1937-1954
- Strickland E, Qu BH, Millen L & Thomas PJ (1997) The molecular chaperone Hsc70 assists the in vitro folding of the N- terminal nucleotide-binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Journal of Biological Chemistry* 272, 25421-25424
- Studier FW & Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189, 113-130
- Sugimoto S, Saruwatari K, Higashi C & Sonomoto K (2008) The proper ratio of GrpE to DnaK is important for protein quality control by the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system and for cell division. *Microbiology* 154, 1876-1885
- Suzuki H, Ikeda A, Tsuchimoto S, Adachi KI, Noguchi A, Fukumori Y & Kanemori M (2012) Synergistic binding of DnaJ and DnaK chaperones to heat shock transcription factor σ 32 ensures its characteristic high metabolic instability: Implications for heat shock protein 70 (Hsp70)-Hsp40 mode of function. *Journal of Biological Chemistry* 287, 19275-19283
- Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, Kayatekin C, Westover KD, Karras GI & Lindquist S (2012) Quantitative analysis of Hsp90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell* 150, 987-1001
- Takakuwa JE, Nitika, Knighton LE & Truman AW (2019) Oligomerization of Hsp70: Current Perspectives on Regulation and Function. *Frontiers in Molecular Biosciences* 6: 81

- Tatsuta T, Model K & Langer T (2005) Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Molecular Biology of the Cell* 16, 248-259
- Terada S, Kinjo M, Aihara M, Takei Y & Hirokawa N (2010) Kinesin-1/Hsc70-dependent mechanism of slow axonal transport and its relation to fast axonal transport. *EMBO Journal* 29, 843-854
- Tessarz P, Mogk A & Bukau B (2008) Substrate threading through the central pore of the Hsp104 chaperone as a common mechanism for protein disaggregation and prion propagation. *Molecular Microbiology* 68, 87-97
- Tsai J & Douglas MG (1996) A Conserved HPD Sequence of the J-domain Is Necessary for YDJ1 Stimulation of Hsp70 ATPase Activity at a Site Distinct from Substrate Binding. *Journal of Biological Chemistry* 271, 9347-9354
- Tsai MY, Morfini G, Szebenyi G & Brady ST (2000) Release of kinesin from vesicles by hsc70 and regulation of fast axonal transport. *Molecular Biology of the Cell* 11, 2161-2173
- Tzankov S, Wong MJH, Shi K, Nassif C & Young JC (2008) Functional divergence between Co-chaperones of Hsc70. *Journal of Biological Chemistry* 283, 27100-27109
- Ungelenk S, Moayed F, Ho CT, Grousl T, Scharf A, Mashaghi A, Tans S, Mayer MP, Mogk A & Bukau B (2016) Small heat shock proteins sequester misfolding proteins in near-native conformation for cellular protection and efficient refolding. *Nature Communications* 7: 13673
- Ung PMU, Thompson AD, Chang L, Gestwicki JE & Carlson HA (2013) Identification of Key Hinge Residues Important for Nucleotide-Dependent Allostery in E. coli Hsp70/DnaK. *PLoS Computational Biology* 9: e1003279
- Uversky VN (2010) The mysterious unfoldome: Structureless, underappreciated, yet vital part of any given proteome. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 568068
- Velasco L, Dublang L, Moro F & Muga A (2019) The complex phosphorylation patterns that regulate the activity of Hsp70 and its cochaperones. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 4122
- Vestergaard B (2016) Analysis of biostructural changes, dynamics, and interactions - Small-angle X-ray scattering to the rescue. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 602, 69-79

Referencias

- Vogel M, Mayer MP & Bukau B (2006) Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker. *Journal of Biological Chemistry* 281, 38705-38711
- Vos MJ, Hageman J, Carra S & Kampinga HH (2008) Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry* 47, 7001-7011
- Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, Mann M & Choudhary C (2011) A Proteome-wide, Quantitative Survey of In Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles. *Molecular & Cellular Proteomics* 10 : M111.013284
- Wallace EWJ, Kear-Scott JL, Pilipenko E v., Schwartz MH, Laskowski PR, Rojek AE, Katanski CD, Riback JA, Dion MF, Franks AM, *et al* (2015) Reversible, Specific, Active Aggregates of Endogenous Proteins Assemble upon Heat Stress. *Cell* 162, 1286-1298
- Walls D, Zyllicz M & Georgopoulos C (1994) The NH₂-terminal 108 amino acids of the Escherichia coli DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 5446-5451
- Wang J, Farr GW, Zeiss CJ, Rodriguez-Gil DJ, Wilson JH, Furtak K, Rutkowski DT, Kaufman RJ, Ruse CI, Yates III JR, *et al* (2009) Progressive aggregation despite chaperone associations of a mutant SOD1-YFP in transgenic mice that develop ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1392-1397
- Wang Z-X (1995) An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule. *FEBS Letters* 360, 111-114
- Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Cizewski Culotta V, Price DL, Wong PC & Rothstein JD (2001) Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiology of Disease* 8, 933-941
- Weibezahn J, Bukau B & Mogk A (2004) Unscrambling an egg: Protein disaggregation by AAA+ proteins. *Microbial Cell Factories* 3: 1
- Weijers M, Barneveld PA, Cohen Stuart MA & Visschers RW (2003) Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral pH described by irreversible first-order kinetics. *Protein Science* 12, 2693-2703

- Wentink AS, Nillegoda NB, Feufel J. *et al.* (2020) Molecular dissection of amyloid disaggregation by human HSP70. *Nature* 587, 483–488
- Wolynes PG, Onuchic JN & Thirumalai D (1995) Navigating the folding routes. *Science* 267, 1619-1620
- Wu CC, Naveen V, Chien CH, Chang YW & Hsiao CD (2012) Crystal structure of DnaK protein complexed with nucleotide exchange factor GrpE in DnaK chaperone system: Insight into intermolecular communication. *Journal of Biological Chemistry* 287, 21461-21470
- Xing Y, Böcking T, Wolf M, Grigorieff N, Kirchhausen T & Harrison SC (2010) Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: Mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *EMBO Journal* 29, 655-665
- Xu X, Sarbeng EB, Vorvis C, Kumar DP, Zhou L & Liu Q (2012) Unique peptide substrate binding properties of 110-kDa heat-shock protein (Hsp110) determine its distinct chaperone activity. *Journal of Biological Chemistry* 287, 5661-5672
- Yamagishi N, Ishihara K & Hatayama T (2004) Hsp105 α suppresses Hsc70 chaperone activity by inhibiting Hsc70 ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry* 279, 41727-41733
- Yamashita H, Kawamata J, Okawa K, Kanki R, Nakamizo T, Hatayama T, Yamanaka K, Takahashi R & Shimohama S (2007) Heat-shock protein 105 interacts with and suppresses aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase: Clues to a possible strategy for treating ALS. *Journal of Neurochemistry* 102, 1497-1505
- Yan M, Li J & Sha B (2011) Structural analysis of the Sil1-Bip complex reveals the mechanism for Sil1 to function as a nucleotide-exchange factor. *Biochemical Journal* 438, 447-455
- Yokom AL, Gates SN, Jackrel ME, Mack KL, Su M, Shorter J & Southworth DR (2016) Spiral architecture of the Hsp104 disaggregase reveals the basis for polypeptide translocation. *Nature Structural and Molecular Biology* 23, 830-837
- Young JC, Barral JM & Hartl FU (2003) More than folding: Localized functions of cytosolic chaperones. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 541-547
- Yu HY, Ziegelhoffer T & Craig EA (2015) Functionality of Class A and Class B J-protein co-chaperones with Hsp70. *FEBS Letters* 589, 2825-2830
- Zeytuni N & Zarivach R (2012) Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure* 20, 397-405

Referencias

- Zhang P, Leu JIJ, Murphy ME, George DL & Marmorstein R (2014) Crystal structure of the stress-inducible human heat shock protein 70 substrate-binding domain in complex with peptide substrate. *PLoS ONE* 9: e103518
- Zhang Y & Zuiderweg ERP (2004) The 70-kDa heat shock protein chaperone nucleotide-binding domain in solution unveiled as a molecular machine that can reorient its functional subdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10272-10277
- Zhuravleva A, Clerico EM & Gierasch LM (2012) An interdomain energetic tug-of-war creates the allosterically active state in Hsp70 molecular chaperones. *Cell* 15, 1296-1307
- Zhuravleva A & Gierasch LM (2011) Allosteric signal transmission in the nucleotide-binding domain of 70-kDa heat shock protein (Hsp70) molecular chaperones. *PNAS* 108, 6987-6992
- Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME & Hendrickson WA (1996) Structural Analysis of Substrate Binding by the Molecular Chaperone DnaK. *Science* 272, 1606-1614
- Ziętkiewicz S, Krzewska J & Liberek K (2004) Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *Journal of Biological Chemistry* 279, 44376-44383
- Ziętkiewicz S, Lewandowska A, Stocki P & Liberek K (2006) Hsp70 chaperone machine remodels protein aggregates at the initial step of Hsp70-Hsp100-dependent disaggregation. *Journal of Biological Chemistry* 281, 7022-7029
- Zimmerman SB & Trach SO (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology* 222, 599-620
- Zolkiewski M (1999) ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* 274, 28083-28086
- Żwirowski S, Kłosowska A, Obuchowski I, Nillegoda NB, Piróg A, Ziętkiewicz S, Bukau B, Mogk A & Liberek K (2017) Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. *The EMBO Journal* 36, 783-796

CAPÍTULO 8

PUBLICACIONES

8. PUBLICACIONES

- 1.- Aguado A, Fernández-Higuero JA, **Cabrera Y**, Moro F, Muga A (**2015**) ClpB dynamics is driven by its ATPase cycle and regulated by the DnaK system and substrate proteins. *Biochemical Journal* 466, 561-570

- 2.- **Cabrera Y**, Dublang L, Fernandez-Higuero JA, Albesa-Jove D, Lucas M, Viguera AR, Guerin ME, Vilar JMG, Muga A, Moro F. (**2019**) Regulation of Human Hsc70 ATPase and Chaperone Activities by Apg2: Role of the Acidic Subdomain. *Journal of Molecular Biology* 431, 444-461

3. - **Cabrera Y**, Bernardo-Seisdedos G, Dublang L, Orozko N, Viguera AR, Millet O, Muga A, Moro F. Fine-tuning of Hsc70 chaperone activity by the distinctive C-terminal extension of human Apg2. ***Manuscrito en preparación.***

