

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***DETERMINACIÓN DEL MECANISMO MECANO-QUÍMICO DE LA
PROTEÍNA BIP EN EL PROCESO DE TRANSLOCACIÓN IN MULTIPLO***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Proteínas
Recombinantes y Biotecnología y Memoria para optar al Título de
Bioquímico por:**

Hilda Marta Alfaro Valdés

Director de Tesis: Dr. Christian A.M Wilson

Santiago-CHILE

Septiembre 2019

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

HILDA MARTA ALFARO VALDES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Proteínas Recombinantes y Biotecnología y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Christian A.M. Wilson

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela

(Presidenta de la Comisión)

Dra. Lorena Norambuena

Dr. Sergio Lobos

Lugares de desarrollo de la tesis:

Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago de Chile

Laboratorio de Randy Schekman, University of California at Berkeley, Estados Unidos.

Financiamiento:

Proyecto de colaboración internacional, código PII20150073: Understanding the importance of the force associated to the domain movements of BiP during protein translocation in the endoplasmic reticulum **2016-2019**. **Proyecto Fondecyt Chile, código: 1181361:** Mechanochemical mechanism of BiP protein and its role in proteostasis and protein translocation **2018-2022**.

Beca de Facultad Magíster, 2017-2019

Congresos:

Poster: New method for microsomes production from *Saccharomyces cerevisiae* for the study of the mechanochemical mechanism of BiP. Alfaro-Valdés, Hilda M., Ramírez, Carolina., Wilson, Christian A.M., Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santos Dumont 964, Independencia, Santiago, Chile. XL congreso de Bioquímica y Biología molecular. Puerto Varas, 26-29 de septiembre 2017.

Poster: Determination of the mechanochemical mechanism of the BiP protein in the translocation process *in multiplo*. Alfaro-Valdés Hilda M.¹, Burgos-Bravo Francesca¹, Lesch Robert², Wilson Christian A.M.¹. (1) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad De Chile. (2) Department of Molecular and Cellular Biology, Howard Hughes Medical Institute, University of California at Berkeley, Berkeley, US. XLI congreso de Bioquímica y Biología molecular. Iquique, 25-28 de septiembre 2018. (premio mención Honrosa).

Presentación oral: The endoplasmic reticulum master regulator protein BiP acts as a ratchet molecular motor in translocation. Alfaro-Valdés Hilda M.¹, New Karina¹, Lesch Robert², Wilson A.M. Christian¹. (1) Biochemistry lab, Biochemistry and Molecular Biology department, Faculty of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Universidad De Chile, Santiago. (2) Department of Molecular and Cellular Biology, Howard Hughes Medical Institute, University of California, Berkeley. XLII congreso de Bioquímica y Biología molecular. Iquique, 08-11 de Octubre 2019. (Resumen aceptado).

Publicaciones:

Mechanical properties of BiP protein determined by nano-rheology. Casanova-Morales, N.; Quiroga-Roger, D.; Alfaro-Valdés, H.M.; Alavi, Z.; Lagos-Espinoza, M.I.A.; Zocchi, G.; Wilson, C.A.M. Mechanical properties of BiP protein determined by nano-rheology. *Protein Science*. 27 (8), 1418- 1426, 2018. doi: 10.1002/pro.3432. (2.523).

DNA Staining Method Based on Formazan Precipitation Induced by Blue Light Exposure. Paredes, A. J.; Alfaro-Valdés, H. M.; Wilson, C. A.M. DNA staining method based on formazan precipitation induced by blue light exposure. *J. Vis. Exp.* (131), e56528, 2018. doi:10.3791/56528. <https://www.jove.com/video/56528/dna-staining-method-based-on-formazan-precipitation-induced-blue> (1,325)

DNA Staining Method Based on Formazan Precipitation Induced by Blue Light Exposure. Aaron J. Paredes, Tatiana Naranjo-Palma, Hilda M. Alfaro-Valdés, Andrés Barriga, Jorge Babul, Christian A.M. Wilson. New visible and selective DNA staining method in gels with tetrazolium salts. *Analytical Biochemistry: Methods in the Biological Sciences*. 517, 31-35, 2017. (2.24).

Mechanical Properties of Chaperone BiP, the Master Regulator of the Endoplasmic Reticulum. Hilda M. Alfaro- Valdés, Francesca Burgos- Bravo, Nathalie Casanova- Morales, Diego Quiroga- Roger and Christian A.M. Wilson. Capítulo en el libro "Endoplasmic Reticulum" de IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.82080. 4 Diciembre 2018.

Post-translational protein translocation through membranes at the single molecule level. Diego Quiroga-Roger, Hilda M. Alfaro-Valdés and Christian A.M. Wilson. Capítulo en el libro "Single Molecule Science" de Cambridge University Press (en prensa). Editor Krishnarao Appasani.

Agradecimientos

En primera instancia agradecerle a mi familia por tener siempre su apoyo en todo momento de la tesis, en especial a mi madre Marta Valdés, quien siempre me motivó a seguir estudiando. Pero por sobre todo, debo agradecer a mi esposo Hernán del Canto, quien siempre me ha dado mucho apoyo durante este proceso. Por otra parte también nombrar a mis amigos Iquiqueños que siempre me han apoyado desde la distancia y en persona, ellos son como mi sol iquiqueño, en especial a mi querido amigo Gabo (Gabriel). También a mis amigos José Aguilera y su polola Francisca, Fabiola Cruz, Karen Polanco, Fernanda Leal, Denisse Miranda, Patricio y mi linda ahijada Mia, Susana y Sandra. A mi padre quien también me apoyó mucho cuando durante este proceso organizamos nuestro matrimonio con Hernán, a mi hermano Felipe, Sofía y mi sobrinito Tomás. Mis seres queridos son lo máximo para mí, y para ellos está dedicada esta tesis, porque el cariño y amor son fundamentales para conllevar todo en la vida.

Por otra parte, muy agradecida del profesor Christian Wilson, quien me motivó para poder entrar al magíster, gracias al profesor, por el crecimiento profesional, y más aún en la investigación, la transmisión del conocimiento, por darme la oportunidad de poder llevar a cabo esta Tesis y por las oportunidades de poder ver como se realiza ciencia en el extranjero. Por otro lado nombrar al gran Lab Manager (Robert Lesch) del laboratorio del premio Nobel Randy Schekman quien me enseñó la extracción de microsomas y además ha estado presente y aportando durante el desarrollo de esta tesis.

A todas las personas que pasaron por el laboratorio y que fueron parte fundamental de esta tesis, aportando en todo momento con sus conocimientos, pero por sobre todo con el mejor apoyo que uno puede tener “el compañerismo”. A Carolina Ramírez, Paulina, Polett, Amparo, Aarón, Esteban, Diego Salas, Andrea Garcés, Tatiana Naranjo, Pilar, María Paz, Maria José, Luka Robeson, Karina New, Francesca Burgos (Iquiqueña), Juan y Valentina. En especial a Diego Quiroga compañero con quien más tuve la oportunidad de compartir, gracias por todos los consejos tanto profesionales como persona es un gran maestro. A Nathalie Casanova, una física muy profesional, científica y excelente persona al igual que Romina Muñoz. Miguel Lagos un gran compañero y persona con quien también logre compartir mucho durante este proceso. A la Profe Toña, la profesora María Antonieta es una gran profesora y persona, gracias profesora por su apoyo, sobre todo cuando da esa palabra de “tranquila te va a ir bien”, ella quizás no sabe cuánto a uno lo tranquiliza. Gracias por sus palabras mágicas y apoyo en este proceso. A la tía Yésica mi gran confidente, gracias tía Yesica por su apoyo técnico, además de todos esos consejos laborales y maternos es una gran persona y la considero como una amiga y su apoyo fue fundamental en esta tesis.

Por sobre todo a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, por la gran acogida, por el apoyo con la beca, porque sin esto no hubiera sido posible para mí, espero haber sido un aporte, en cuanto a la ciencia y por sobre todo con esta tesis. Gracias también a todos los profesores que aportaron de alguna manera: profesora Daniela Seelenfreund, Sergio Lobos, Mauricio Baez y al grupo del profesor Mauricio Baez: Maira Rivera, Rodrigo, Andrés Bustamante (Iquiqueño), Alejandro, Álvaro (donador de la Titina). Por supuesto agradecer enormemente a la comisión evaluadora por su gran aporte en guiar esta tesis: Profesora María Antonieta, Profesor Sergio Lobos y Lorena Norambuena.

Esta Iquiqueña se encuentra muy agradecida de todos!!!!

INDICE

	Pág.
Índice	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	V
Abreviaturas	VI
Resumen	VII
Abstract	VIII
I. Introducción	1
1.1. Mecanismo post-traducciona l en células eucariotas	1
1.2. Complejo Sec61	2
1.3. BiP (Proteína de unión a inmunoglobulina)	3
1.4. BiP como un motor molecular	5
II. Hipótesis de trabajo y objetivos	8
2. Hipótesis	8
3. Objetivos	8
3.1. Objetivo general	8
3.2. Objetivos específicos	8
IV. Materiales y metodología	10
4.1. Reactivos e insumos	10
4.2. Metodología	12
4.2.1. Diseño y producción de las proteínas quiméricas sustrato para el complejo Sec61 con diferentes fuerzas de desplegamiento	12
4.2.2. Amplificación de las diferentes proteínas en estudio, para la construcción de las proteínas quimera sustrato para el complejo Sec61, que serán usadas en los ensayos de translocación <i>in vitro</i>	13
4.2.3. Ligación a secuencia sintética de translocación, transformación y extracción de DNA	15
4.2.4. Expresión y purificación de las proteínas quimeras	16
4.2.5. Extracción de microsomas por el método de Schekman	17
4.2.6. Funcionalidad de los microsomas obtenidos	19
4.2.7. Ensayos de translocación <i>in vitro</i>	20

V. Resultados	22
5.1. Objetivo específico 1: Diseñar y producir proteínas quimeras sustrato para el complejo Sec61 con diferentes fuerzas de desplegamiento que serán usadas en ensayos de translocación <i>in vitro</i>	22
5.1.1. Subclonamiento de la secuencia nucleotídica sintética de translocación con las diferentes proteínas plegadas en estudio Calmodulina, Titina y Top7 en el plásmido de expresión pET21d	22
5.1.2. Expresión y purificación de las proteínas quiméricas de CaM, Titina y Top7	24
5.2. Objetivo específico 2: Obtener microsomas para ensayar la translocación de las proteínas con diferentes fuerzas de desplegamiento	30
5.2.1. Extracción de Microsomas	30
5.2.2. Evaluación de la integridad y funcionalidad de los microsomas purificados por el Método combinado Parodi Schekman y por método Schekman mediante radioactividad	31
5.2.3. Evaluación de la pérdida de BiP en el proceso de purificación por el Método combinado Parodi Schekman	33
5.3. Objetivo específico 3: Determinar mediante ensayos de translocación el rango de fuerza generado por BiP durante el proceso de translocación post-traducciona l de las diferentes proteínas quimeras	37
5.3.1. Ensayos de translocación <i>in vitro</i>	37
VI. Discusión	52
VII. Conclusiones	55
VIII. Proyecciones	56
IX. Material suplementario	57
X. Bibliografía	60

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema de translocación post-traducciona de proteína en célula eucariota	2
Figura 2. Estructura del translocon post-traducciona (complejo Sec61) obtenido por crío microscopia electrónica	3
Figura 3. Estructura de BiP PDB 5E84	4
Figura 4. Esquema de los dos mecanismos de BiP en translocación	5
Figura 5. Diagrama de proteína ADN-quimera	7
Figura 6. Modelo experimental de translocación <i>in multiplo</i>	9
Figura 7. Secuencia sintética con sitios de restricción para la obtención de las diferentes proteínas quiméricas	12
Figura 8. Sitios de restricción para las diferentes quimeras	14
Figura 9. Translocón de <i>Saccharomyce cerevisiae</i>	20
Figura 10. Colonias positivas del subclonamiento de secuencia nucleotídica sintética de	23
Figura 11. Fracciones obtenidas de la purificación de CaM por columna de Níquel	24
Figura 12. Western Blot de las fracciones obtenidas en la purificación de CaM por columna de Níquel	25
Figura 13. Fracciones obtenidas de la purificación de CaM por columna de Níquel	26
Figura 14. Comparación de la obtención de la Quimera-CaM purificada sin Ca ⁺² vs el pella post-sonicación	28
Figura 15. Proteínas purificadas usadas como control positivo PpαF, proteína quimera de Titina y control negativo Top7	29
Figura 16. Esquema de obtención de microsomas purificados por el método combinado Parodi Schekman	31
Figura 17. Western Blot del complejo Sec61	32
Figura 18. Ensayo de translocación con microsomas preparados por MS <i>versus</i> método combinado PS con PpαF radioactiva	33
Figura 19. Cuantificación de proteína BiP por Western Blot en el proceso de obtención de microsomas en método combinado PS	34

Figura 20. Curva de calibración de la proteína BiP purificada	35
Figura 21. Translocación de Pp α F usando Anti-His	38
Figura 22. Translocación de Pp α F usando Anti-Pp α F	39
Figura 23. Agregación de la proteína quimérica Titina en el tiempo usando un anti-His	41
Figura 24. Translocación con la proteína quimérica Titina usando anti-His	42
Figure 25. Translocación con la proteína quimérica Top7 usando anti-His	44
Figura 26. Prueba del anticuerpo contra el <i>Tag</i> de Histidina en el ensayo de translocación con la proteína quimera CaM	46
Figura 27. Prueba del anticuerpo contra CaM en el ensayo de translocación con la proteína quimera CaM en presencia de calcio	47
Figura 28. Translocación con la proteína quimérica CaM usando anti-CaM	48
Figura 29. Translocación con la proteína quimérica CaM y 5 mM de EDTA usando anti CaM	49
Figura 30. Translocación con la proteína quimérica CaM con 5mM de EDTA y 1 M Urea usando anti-CaM	50
Figura 31. Esquema general del análisis de datos	54
Figura 32. Esquema de translocación con la proteína quimérica CaM usando un anti-Titina	56
Figura 33. Colonias positivas del subclonamiento de secuencia nucleotídica sintética de	57
Figura 34. Colonias positivas del subclonamiento de secuencia nucleotídica sintética de translocación con Top7 en el plásmido de expresión pET21d	58
Figura 35. Gráfico de absorbancia 280 nm <i>versus</i> las fracciones obtenidas en columna de exclusión molecular	59

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Fuerzas de desplegamiento de las diferentes proteínas en estudio, obtenidas por pinzas óptica	13
Tabla 2. Secuencia de los partidores para las diferentes proteínas quimeras en estudio con los sitios de restricción de EcoRI y XbaI	15
Tabla 3. Señales m/z experimentales versus teóricas	26
Tabla 4. Píxeles obtenidos desde las distintas concentraciones de BiP	35
Tabla 5. Concentración de BiP durante el proceso de extracción de microsomas y comparación de BiP final MS y método combinado PS	36

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BiP	Proteína de unión a inmunoglobulina
CaM	Calmodulina
His	Histidina
Hsp70	Proteína de Shock térmico de 70 kDa
IPTG	isopropyl- β -Dthiogalactopyranoside
LB	Medio Luria Bertani
MP	Método Parodi
MS	Método Schekman
NBD	Dominio de unión a nucleótido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas
pN	Pico Newtons
PpαF	Pre-pro-alfa-Factor
PS	Método combinado Parodi Schekman
RE	Retículo endoplasmático
SBD	Dominio de unión a substrato
TM	Transmembrana
UPR	Activación de la respuesta de proteínas desplegadas

RESUMEN

Translocación post-traducciona de proteínas a través del retículo endoplasmático es mediado por una proteína canal denominado complejo Sec61 y una proteína motor auxiliar llamada BiP (por *Immunoglobulin Binding Protein*). BiP es una proteína miembro de la familia de chaperonas Hsp70 (*Heat Shock Protein 70*). Por otra parte se ha planteado que es un motor molecular, ya que es una ATPasa y se ha sugerido que se encuentra involucrado en la aplicación de fuerza durante el proceso post-traducciona de translocación de proteínas. La fuerza ejercida por BiP no ha sido completamente dilucidada y hay estudios que sugieren que BiP podría estar involucrada en un mecanismo pasivo de rectificación del movimiento o del inglés *ratchet* y/o posiblemente en un mecanismo activo de tiraje directo o del inglés *power stroke*.

Una forma directa de poder dilucidar este mecanismo, es mediante una técnica denominada “pinzas ópticas” que permiten la medición de fuerzas en biomoléculas. Este instrumento ha sido usado por nuestro laboratorio para intentar medir fuerzas en el proceso de translocación, sin embargo, esta estrategia experimental en nuestro sistema de translocación, ha presentado dos principales dificultades. Para poder mantener el complejo Sec61 solubilizado se requiere de un detergente el cual genera micelas que dificultan la medición, al interferir con el láser del instrumento (observación experimental de nuestro laboratorio). Además la velocidad de translocación es muy lenta para el sistema de pinzas ópticas (1,1 aminoácidos por segundo), por lo cual compite con el ruido instrumental.

Por lo tanto, en este trabajo se propuso utilizar un nuevo método para poder determinar el mecanismo mecano-químico de BiP en el proceso de translocación post-traducciona. Este consistió en utilizar ensayos de translocación *in vitro* y medir las fuerzas generadas por BiP *in multiplo* (es decir, *in vitro* de muchas moléculas a la vez), utilizando proteínas sustratos que se despliegan a diferentes fuerzas (cuyas fuerzas de desplegamiento han sido determinadas por pinzas ópticas o por AFM). Se usaron diferentes construcciones para realizar ensayos de translocación, la construcción de la proteína quimérica de Titina usado como control positivo demostró ser translocada en el ensayo de protección en microsomas obteniéndose un 31% de translocación. Posteriormente, el control negativo de la construcción de la proteína quimérica de Top7 demostró no ser translocada debido a la alta fuerza de desplegamiento que posee esta proteína escapando de los niveles de fuerza que podría generar un motor molecular de *power stroke*. Por último, la proteína quimera de CaM demostró tampoco ser translocada sugiriendo de esta forma que la proteína BiP estaría actuando como un motor molecular de tipo *ratchet* en translocación post-traducciona de proteínas.

ABSTRACT

Post-translational protein translocation through the endoplasmic reticulum is mediated by a channel protein called Sec61 complex and an auxiliary motor protein called BiP (by Immunoglobulin Binding Protein). BiP is a protein member of the Hsp70 chaperone family (Heat Shock Protein 70). On the other hand, it's been proposed that it's a molecular motor, since BiP is an ATPase and it's been suggested that this protein is involved in the application of force during the post-translational process of protein translocation. The force exerted by BiP has not been completely elucidated and studies suggest that BiP could be involved in a passive rectification mechanism of the movement or ratchet and / or possibly in an active mechanism of direct pull or English power stroke.

A direct way to elucidate this mechanism is by a technique called "optical tweezers" that allows the measurement of forces in biomolecules. This instrument has been used by our laboratory to try to measure forces in the translocation process, however this experimental strategy in our translocation system has presented two main difficulties; In order to maintain the Sec61 complex solubilized, a detergent is required, which generates micelles that make measurement difficult, by interfering with the laser of the instrument (experimental observation of our laboratory). In addition, the speed of translocation is very slow for the system of optical tweezers (1.1 amino acids per second), which competes with the instrumental noise.

Therefore, in this work we propose to use a new method to determine the mechanochemical mechanism of BiP in the post-translational translocation process. This consists of using *in vitro* translocation assays and measuring the forces generated by BiP *in multiplo* (is to say, *in vitro* of many molecules at the same time), using protein substrates that are deployed at different forces (whose unfolding forces have been determined by optical tweezers or by AFM). Different constructs were used to perform translocation assays, the titin chimera protein construct used as a positive control proved to be translocated in the protection test in microsomes obtaining a 31% translocation. Subsequently, the negative control of the Top7 chimera protein construct proved not to be translocated due to the high unfolding force that this protein has, escaping from the levels of force that a molecular power-stroke engine could generate. Finally, the CaM chimera protein also showed not to be translocated, thus suggesting that the BiP protein would act as a ratchet-type molecular motor engine in post-translational protein translocation.

INTRODUCCION

La vía de secreción de proteínas es muy importante para las células eucariotas ya que es la responsable de la síntesis, plegamiento y suministro de proteínas extra-celulares y de membrana. Al menos un 30% de las proteínas pasan por la vía secretoria (Arora & Tamm, 2001). En células eucariotas, las proteínas secretadas hacia el exterior son sintetizadas en el citoplasma y transportadas dentro del retículo endoplasmático (RE), luego pasan al aparato de Golgi y finalmente hacia las vesículas secretoras (Palade, 1975). Blobel y Sabatini en 1970 descubrieron la secuencia señal en el N-terminal de la proteína secretora que luego es reconocido por un canal por donde pasa la proteína, facilitando su entrada hacia el interior del RE (Blobel & Dobberstein, 1975; Sabatini *y cols.*, 1982). El canal por el cual pasan las proteínas es llamado complejo Sec61 (Rapoport, 2007; Zimmermann *y cols.*, 2011); y existen dos mecanismos de transporte de la proteína secretora hacia el RE: mecanismo de translocación co-traducciona l y post-traducciona l. Sin embargo, en este estudio nos centraremos en el mecanismo post-traducciona l, ya que el proceso por el cual la proteína logra ser translocada es menos conocido en este mecanismo y es el más usado por otros organelos como mitocondrias y cloroplastos.

1.1.- Mecanismo post-traducciona l en células eucariotas.

El mecanismo post-traducciona l consiste en que la cadena polipeptídica es sintetizada completamente en el citoplasma (**Figura 1**). Esta proteína es mantenida en un estado desplegado el cual es mediado por chaperonas del tipo Hsc70 (*Heat shock cognate 70*). Estas chaperonas se encuentran en el citoplasma e interactúan con la cadena polipeptídica luego de haber sido sintetizada completamente por el ribosoma manteniéndola de esta forma en un estado desplegado, conformación competente para la translocación (Chirico *y cols.*, 1988; Mandon *y cols.*, 2013). La proteína desplegada expone en su extremo N-terminal la secuencia señal que es reconocida por el canal (complejo Sec61) y luego es translocada hacia el RE (Johnson *y cols.*, 2013).

Este mecanismo comenzó siendo estudiado en levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, mediante estudios de translocación, que consisten en usar RE fragmentado denominado como “microsomas” los cuales son vesículas lipídicas que contienen el complejo Sec61, y en su interior los demás componentes provenientes del lumen del RE (Panzner *y cols.*, 1995). Además, proteoliposomas reconstituidos con el complejo Sec61 también han sido usados, evidenciando que este proceso es dependiente de ATP (Adenosín trifosfato) (Gorlich & Rapoport, 1993).

La hidrólisis de ATP es llevada a cabo por otra proteína, llamada BiP, que se encuentra dentro del RE y su actividad ATPasa incrementa cuando BiP interactúa con el dominio J de la proteína Sec63 que forma parte del complejo Sec61. Algunas mutaciones en el complejo Sec62/Sec63 inhiben la translocación postraduccional *in vivo* e *in vitro*. Por lo tanto, el complejo Sec62/Sec63 es un componente importante para este proceso. Además se ha reportado mediante un ensayo *in vivo* que una cepa de levadura con una mutación en BiP (cepa llamada MS177 con la mutación descrita como *kar2-159*) la translocación es bloqueada (Vogel y cols., 1990). Por otra parte alteraciones en residuos críticos en el dominio J de Sec63 inhiben la interacción entre Sec63 y BiP (Vembar y cols., 2010). Por lo tanto BiP es fundamental en el proceso de translocación post-traduccional.

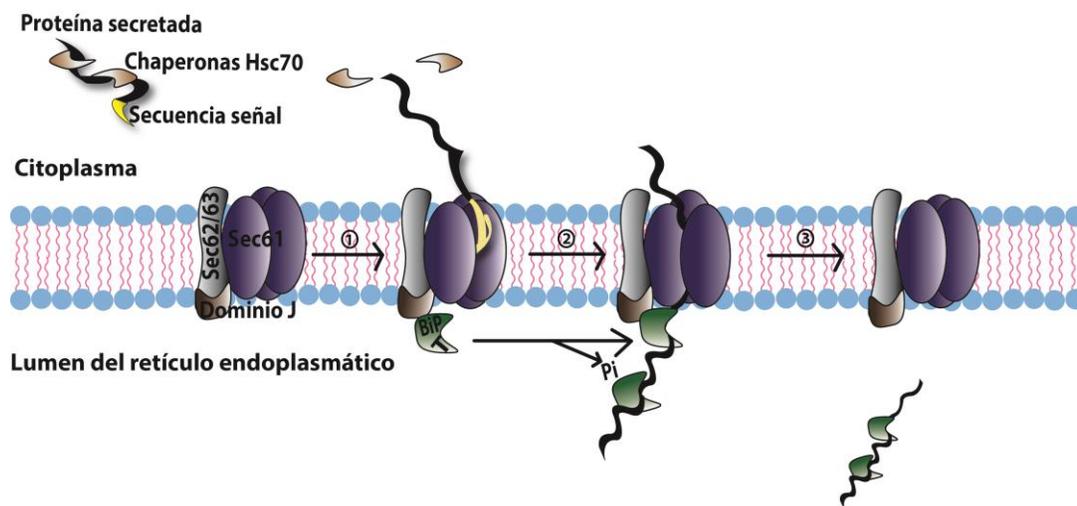


Figura 1.- Esquema de translocación post-traduccional de proteína en célula eucariota. Se muestra el proceso post-traduccional de la proteína secretoria que primero interacciona con chaperonas del tipo Hsc70 que la mantienen desplegada y competente para la translocación. En amarillo la secuencia señal que es reconocido por el canal Sec61 embebido en la membrana plasmática del RE. En 1 se muestra la unión al canal mediante la secuencia señal y en el lado interno del RE se muestra el dominio J del complejo Sec62/Sec63 que interactúa con BiP, que participa mediante hidrólisis de ATP la unión a la cadena polipeptídica entrante (BiP T quiere decir, unida a ATP). En 2 se muestra como BiP se une a la cadena polipeptídica y de esta forma la cadena es ingresada hacia el RE como se observa en 3.

1.2.- Complejo Sec61

El complejo Sec61 es una proteína trimérica de 52 kDa, está compuesta por las subunidades (α , β y γ) contiene 10 hélices transmembranas (TM) alrededor del poro central, el cual lo compone la subunidad α (Pilon y cols., 1998; Van den Berg y cols., 2004). En translocación post-traduccional requiere del complejo Sec62/Sec63 además de otras proteínas accesorias como Sec71 y Sec72 (Jung y cols., 2014). Este canal de eucariontes posee una alta identidad de secuencia con la proteína de translocación de *Escherichia*

coli denominada SecY (Jungnickel y cols., 1994), la cual ha sido extensamente estudiado por cristalografía de rayos X. En cuanto a la obtención de estructura cristalina de Sec61 ha sido difícil de obtener, ya que al ser la purificación *in vivo* desde levadura, estos pueden tener modificaciones post-traduccionales, además no se ha obtenido una buena cantidad de proteína. Una de las primeras estructuras obtenidas fue mediante Criomicroscopía electrónica (*Cryo-EM*) por Bekman y cols. (1997) del translocon co-traducciona, también existe una estructura obtenida desde levadura del translocon post-traducciona por microscopía electrónica como se muestra en la **Figura 2**, no obstante el mapa que se obtiene es de baja resolución y carece de detalles estructurales (Beckmann y cols., 1997; Harada y cols., 2011). Sin embargo, recientemente mediante Criomicroscopía electrónica, se han obtenido nuevas estructuras del complejo Sec61 desde *Saccharomyces cerevisiae* (Itskanov & Park, 2019; Wu y cols., 2019).

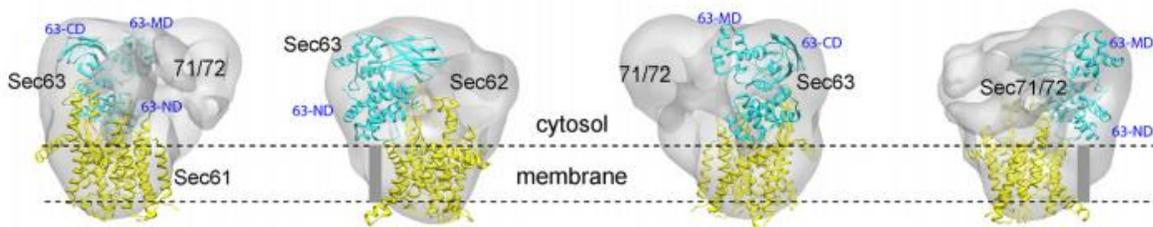


Figura 2.- Estructura del translocon post-traducciona (complejo Sec61) obtenido por crío microscopía electrónica. Imágenes reconstruidas por crío microscopía electrónica del translocón con una resolución de 20 Å, compuesto por Sec62/Sec63 y Sec72. En amarillo se observa el complejo Sec61, en celeste complejo Sec63, barra en gris representa una hipotética hélice transmembrana de Sec63 que precede al subdominio N-terminal (63-ND) del dominio citosólico Brl de Sec63. El medio helicoidal (63-MD) y los subdominios unidos a inmunoglobulina en C- terminal (Sec63-CD) son etiquetados (Harada y cols., 2011).

1.3.- BiP (Proteína de unión a inmunoglobulina)

BiP originalmente fue identificada independientemente como: una cadena pesada de la proteína de unión a la inmunoglobulina y como la proteína regulada por la glucosa, Grp78 (Zimmermann y cols., 2011). BiP también ha sido referida como el regulador maestro del RE porque juega un rol importante en los procesos y funciones del RE (Hendershot, 2004), tal como la síntesis de proteína, plegamiento, montaje, activación de la respuesta de proteínas desplegadas (Ruprecht y cols.) y translocación a través del RE (Behnke y cols., 2015; Zimmermann y cols., 2011).

Estructuralmente BiP, se encuentra conformado por un dominio N-terminal con actividad ATPasa denominado como dominio de unión a nucleótido (*Nucleotide Binding Domain*, NBD) y un dominio C-terminal de unión a sustrato (*Substrate Binding Domain*, SBD) el cual contiene un subdominio α y un subdominio β

(Figura 3). Además NBD y SBD se encuentran conectados por un conector (*linker*) hidrofóbico PDB 5E84 (Yang y cols., 2015). Cuando BiP une ATP, la afinidad por el péptido es baja porque la tapa es abierta, cuando el ATP es hidrolizado a ADP la tapa se cierra incrementando la afinidad por el péptido. El intercambio de ADP a ATP disminuye la afinidad por el péptido lo que facilita su liberación (Behnke y cols., 2015).

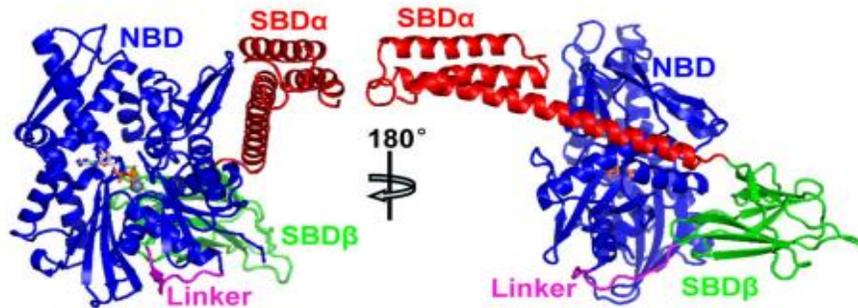


Figura 3.- Estructura de BiP PDB 5E84. Se muestra un diagrama de cinta de la estructura de BiP-ATP obtenida por cristal y a la izquierda imagen de la estructura de BiP girada en 180°C. En azul corresponde al dominio de unión a nucleótido (*Nucleotide Binding Domain*, NBD), rojo el subdominio α del dominio de unión a sustrato (*Substrate Binding Domain*, SBD), en verde el subdominio β del dominio de unión a sustrato SBD y en rosado un conector hidrofóbico (Yang y cols., 2015).

BiP se encuentra localizado en el lumen del RE y se une en un estado abierto al polipéptido cuando este interactúa con el dominio J de Sec63 (Misselwitz y cols., 1999; Yang y cols., 2015). Cuando BiP se une al dominio J, BiP hidroliza el ATP el cual permite la interacción con la cadena polipeptídica que está cruzando a través del complejo Sec61. BiP sufre un cambio conformacional al unirse a la cadena polipeptídica. Cuando BiP interactúa con el dominio J de Sec63, baja la especificidad por el sustrato, esto quiere decir que es capaz de interactuar con cualquier secuencia de la cadena polipeptídica (Matlack y cols., 1999). En cambio cuando no interactúa con dominio J solo se une a una secuencia consenso, la cual es Hy (WX)HyXHyXH_y, donde Hy es un residuo aromático voluminoso o residuo hidrofóbico, W es triptófano, y X es cualquier aminoácido (Blond-Elguindi y cols., 1993). Un estudio reciente realizado por nuestro laboratorio demuestra que BiP se une más afín al polipéptido, estando en la forma ADP-BiP, cuando BiP se comporta como chaperona en el plegamiento y replegamiento de una proteína denominada MJ0336. Mediante la técnica de pinzas ópticas fue observado que BiP previene el replegamiento cuando se une a la proteína a bajas concentraciones de ATP, en presencia de ADP la afinidad por la proteína sustrato aumenta un orden de magnitud (Ramirez y cols., 2017).

También ha sido reportado que para los 165 aminoácidos de la cadena polipeptídica de pre-pro- α -Factor (Pp α F), son unidas cerca de 6 a 7 proteínas de BiP, pero este número puede variar, en función del posible intercambio de varias proteínas BiP que pueden preferir unirse a la cadena polipeptídica (Schekman,

1994). La fuerza ejercida por BiP en la translocación de proteína no es clara, sin embargo, algunos estudios sugieren que BiP puede estar involucrado en un mecanismo pasivo de rectificación del movimiento o en inglés “*ratchet*” o mecanismo activo de tiraje directo o en inglés “*power stroke*” (Matlack y cols., 1999). Esto podría demostrar que BiP actúa como un motor molecular.

1.4.- BiP como un motor molecular

Los motores moleculares son responsables del movimiento en la vida de los organismos, por el consumo de la energía química convertida en movimiento. Por ejemplo, enzimas motoras usan la energía de nucleótidos por unión y/o hidrólisis del producto liberado para generar el trabajo mecánico. En consecuencia estos motores enzimáticos deben acoplar uno o más pasos químicos para la transición mecánica. Por lo tanto existen muchas proteínas que se comportan como diminutas máquinas. Por ejemplo: la miosina, kinesina y familias de dineínas usan la hidrólisis de ATP como fuente de energía para avanzar un tramo y generar trabajo (Bustamante y cols., 2004).

El modelo pasivo de “*ratchet*”, consiste que el motor molecular, usa la unión y/o hidrólisis de ATP para rectificar el movimiento browniano con un movimiento neto en una dirección específica (Astumian, 1997). En el modelo activo de “*power stroke*”, el motor utiliza la unión y/o hidrólisis de energía de ATP del producto liberado para manejar el movimiento en una sola dirección, ejerciendo un trabajo mayor al baño térmico el cual es de $3K_B T$ donde K_B es la constante de Boltzmann y T temperatura (Smith y cols., 2001) (Figura 4).

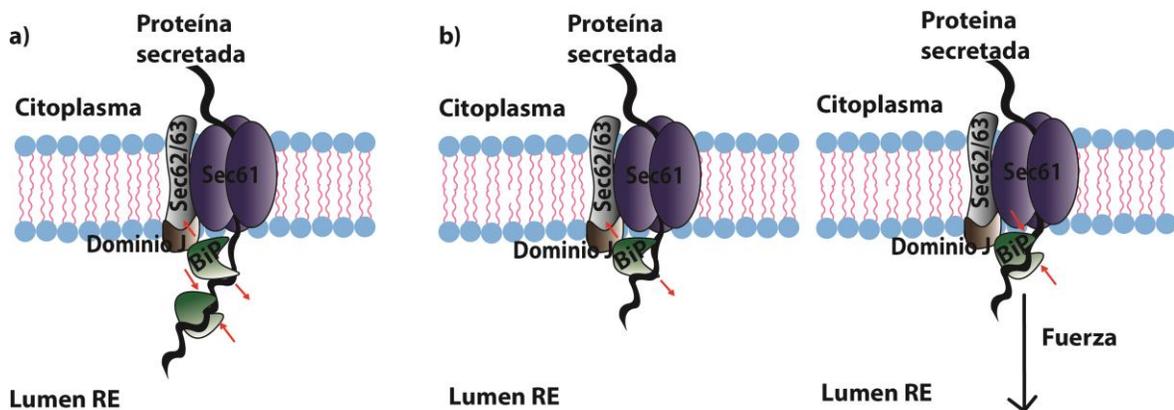


Figura 4.- Esquema de los dos mecanismos de BiP en translocación. Se muestra como BiP podría estar involucrado en el proceso de transporte de la proteína. En a) se muestra la teoría *ratchet* que consiste que varias BiP se estarían uniendo a la cadena entrante y de esta forma la cadena no se devuelve hacia el citoplasma. En b) se muestra la teoría de *power stroke* que consiste en que BiP se une a la cadena polipeptídica ejerciendo una fuerza mayor a la del baño térmico. Flechas rojas hacia afuera indican BiP abierta; Flechas rojas hacia adentro indican BiP cerrada.

Por lo tanto estos dos mecanismos propuestos explican cómo chaperonas del tipo Hsp70s, en este caso BiP, podría estar contribuyendo en estos procesos. Un estudio realizado por Matlack y cols. (1999) mediante un ensayo de translocación *in vitro* en que proteoliposomas reconstituidos con el complejo Sec61 fueron usados reemplazando a BiP por anticuerpos agonistas de pre-pro- α -Factor (Pp α F) dentro del proteoliposoma, observándose que Pp α F fue translocada, por la unión de varios anticuerpos (Matlack y cols., 1999). Por ello determinaron que BiP actúa como un mecanismo pasivo, previniendo que la cadena polipeptídica se devuelva hacia el citoplasma. Sin embargo, al observar con detalle estos resultados, nos hemos podido dar cuenta que la eficiencia de translocación es baja (alrededor de un 20%), por lo cual esto nos sugiere que el resto de la eficiencia de translocación podría estar mediada por un mecanismo activo (es decir hasta un 80%). Por otro lado existe un estudio de modelamiento computacional por De los Rios y cols. (2007) que sugiere que la fuerza realizada por BiP es de alrededor de 15 pN, siendo necesaria para la translocación de una cadena polipeptídica (Rios y cols., 2007). Este estudio propone un mecanismo de translocación combinado de *ratchet* y *power stroke*. BiP es específica del RE, pero hay otras Hsp70 con una muy alta identidad de secuencias tanto en cloroplastos como en mitocondrias. En cloroplastos se ha demostrado que además de BiP hay otro motor molecular llamado Hsp93 que actúa en conjunto con otras proteínas para el importe de proteínas dentro del cloroplasto y sería el que generaría fuerza (Nakai, 2018). En mitocondrias no estaría ese motor molecular auxiliar, sin embargo existe una Hsp70 implicada en el importe de proteínas lo que haría que el mecanismo de translocación muy similar al de RE (Ruprecht y cols., 2010).

Pinzas ópticas es un instrumento que puede medir fuerzas en biomoléculas y han sido usadas en nuestro laboratorio para determinar las fuerzas ejercidas por BiP en translocación. Desafortunadamente, esto ha sido muy difícil dado a que el complejo Sec61 es una proteína de membrana. Datos preliminares de pinzas ópticas obtenidos en nuestro laboratorio, muestran la formación de micelas cuando se utiliza la digitonina como detergente, la cual mantiene soluble el complejo Sec61. Estas micelas interfieren con el atrapamiento del láser ya que chocan con las bolitas donde se toma la muestra. Por otro lado el proceso de translocación ocurre 1,1 aminoácido por segundo (Liebermeister y cols., 2001). Esta velocidad es baja cuando se mide en tiempo real con las pinzas ópticas y es similar al tiempo de ruido del instrumento de modo que esto se convirtió en un experimento muy difícil de hacer a nivel de una sola molécula con el instrumento que tenemos de pinzas ópticas (Ramirez y cols., 2017). Sin embargo, no todos los estudios de medición de fuerza son realizados a nivel de molécula individual. Otra posible técnica es medición de fuerza *in multiplo*. No hay muchos sistemas de medición de fuerzas en la literatura que lo midan *in multiplo* o en asamblea estadística. Uno de aquellos es el realizado por Choi & Zocchi (2007). En dicho estudio se usó una hebra de ADN acoplada a una enzima generando una tensión, obstaculizando el movimiento de la enzima (**Figura 5**); sin embargo,

este método no es posible para nuestro estudio porque nosotros necesitamos acoplar el proceso de translocación.

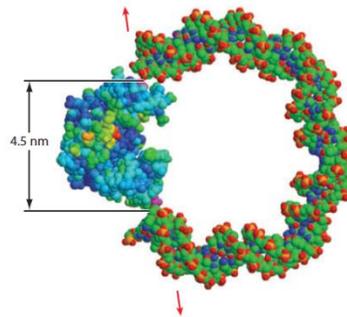


Figure 5.– Diagrama de proteína ADN-quimera. La estructura de la guanilato quinasa (PDB: IS4Q) y el ADN es desde estructura del nucleosoma IKX5 y es dibujado aproximadamente a escala con respecto a la proteína. La distancia entre los puntos adjuntados al ADN en la proteína es de 4,5 nm. En la forma de doble cadena, el resorte de ADN ejerce una presión sobre la proteína que tiende a separar los puntos de unión como se muestra en las flechas rojas (Choi & Zocchi, 2007).

Hasta el momento no ha existido un estudio experimental que pueda decir sin lugar a dudas qué tipo de motor molecular es la proteína BiP, ya que no ha habido aproximaciones experimentales en medir la fuerza directamente en este sistema. Por lo tanto, el mecanismo por el cual actúa BiP en translocación post-traduccional de proteínas sigue siendo desconocido y difícil de determinar sobre todo a nivel de molécula individual mediante pinzas ópticas. Por esta razón basándonos en los antecedentes anteriormente mencionados y en los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, este trabajo tiene por objetivo determinar el mecanismo mecano-químico de la proteína BiP en translocación post-traduccional de proteínas mediante un nuevo método de medición de fuerzas *in multiplo*. Esto no solo permitirá entender el mecanismo de translocación en RE, sino también en otros organelos como en mitocondrias.

2.- HIPOTESIS

En el mecanismo de acción de la proteína BiP como motor molecular, ésta ejerce una fuerza de tiraje que permite translocar proteínas post-traduccionalmente (mecanismo denominado “*power stroke*”).

3.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL

- Determinar el mecanismo mecano-químico de la proteína BiP en la translocación post-traducciona, mediante una nueva metodología *in multiplo*, basada en el uso de proteínas sustrato con diferentes fuerzas de desplegamiento para la translocación *in vitro*. Esto permitirá determinar si BiP es capaz de aplicar una fuerza suficiente para translocar la proteína sustrato y por lo tanto desplegarla.

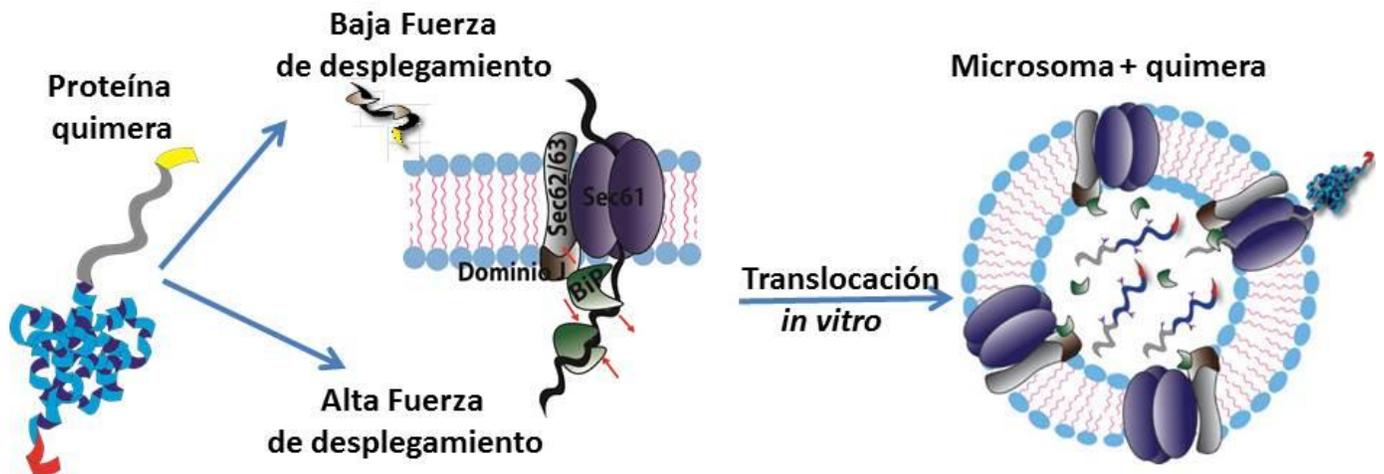
3.1.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.1.2.- Diseñar y producir proteínas quimeras sustrato para el complejo Sec61 con diferentes fuerzas de desplegamiento que serán usadas en ensayos de translocación *in vitro*.

3.1.3.- Obtener microsomas para ensayar la translocación de las proteínas con diferentes fuerzas de desplegamiento.

3.1.4.- Determinar mediante ensayos de translocación el rango de fuerza generado por BiP durante el proceso de translocación post-traducciona de las diferentes proteínas quimeras.

Modelo experimental de translocación *in multiplo*



¿será capaz  de translocar alguna de estas proteínas?



Figura 6.- Modelo experimental de translocación *in multiplo*. Esquema que representa el diseño experimental en que se usa una proteína quimera que contiene: la secuencia señal de reconocimiento para el complejo Sec61 (amarillo); una proteína desplegada llamada Titina (Kaiser y cols.); y una proteína plegada que posee una fuerza de desplegamiento conocida a través de Pinzas Ópticas (azul). Se realizará una proteína de baja fuerza y otra de alta fuerza de desplegamiento. Finalmente una cola de histidinas que permitirá purificar la proteína. Esta quimera será usada para realizar ensayos de translocación *in vitro*, con microsomas provenientes desde levadura y posteriormente se observara si BiP es capaz de desplegar la proteína quimera y por lo tanto translocarla. Posteriormente, el análisis de dato nos daría a entender que si pasa la proteína de baja fuerza y no la de alta fuerza se estaría sugiriendo un mecanismo “*ratchet*”. Por otro lado, si pasa tanto la de baja fuerza y la de alta fuerza de desplegamiento, se podría sugerir que BiP sería un motor molecular del tipo “*power stroke*”.

4.- MATERIALES Y MEODOLOGIA

4.1.- REACTIVOS E INSUMOS

Reactivo	Marca	N° de catálogo
Acrilamida	Invitrogen	15512023
Agar-Agar	Merck	1016141000
Agarosa	Merck	16802
Ampicilina Sal de Sodio	Sigma	A0166
Azida de Sodio	Sigma	S2002
BamHI	New England BioLabs	R0136S
EasyTag Methionine L-[³⁵ S]	PerkinElmer	NEG709A500UC
EcoRI	New England BioLabs	R01015
E-64	Sigma	1002110975
Esferas de vidrio de 0.5mm de Zirconia/Silica	BioSpec	11079105z
Extracto de levadura	winkler	212750
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	Sigma	78830-1G
Glicina	Merck	120081000
Glucosa	Merck	1083421000
Hidroximetil aminometano	Merck	1.08382.1000
HindIII	New England BioLabs	R01045
Imidazol	UsBiological	288-32-4
Isopropil-B-D-1-tiogalactopiranosodico	Gold-Bio	12481C25
Leupeptina	Sigma	L0649-5MG
Membrana de nitrocelulosa	Macherey-Nagel	741280
Metanol	Merck	1.06009.2500
Cloruro de Sodio	New England BioLabs	R0193S
NcoI	New England BioLabs	R0111S
NdeI	Sigma	P5318
Pepstatina	Merck	72161000
Peptona	Merck	7651
Sacarosa	Life Technologies	EP0402

Taq DNA polimerasa	New England BioLabs	M0202S
T4 Dna ligasa	Merck	1083821000
TLCK	Sigma	T-7254
West Femto	ThermoScientific	1856189
Xbal	New England Biolabs	R0145S

4.2.- METODOLOGIA

4.2.1.- Diseño y producción de las proteínas quiméricas sustrato para el complejo Sec61 con diferentes fuerzas de desplegamiento.

El diseño de las proteínas quiméricas, consistió en una secuencia nucleotídica que contiene la secuencia señal de reconocimiento por el complejo Sec61, seguido de una Titina que se mantiene desplegada gracias a que contiene mutaciones en su secuencia. Posterior a la secuencia nucleotídica de Titina se colocará la secuencia nucleotídica de una proteína plegada que posee una determinada fuerza de desplegamiento que ha sido determinada por pinzas ópticas (**Tabla 1**) y finalmente la secuencia nucleotídica que se traduce a 6 histidinas que permitirá la purificación de la proteína quimera. A toda esta secuencia le hemos denominado como secuencia sintética de translocación.

La construcción de la quimera se mandó a sintetizar a la empresa IDT (IDT, USA). Esta secuencia nucleotídica contiene diferentes sitios de restricción para el clonamiento y subclonamiento de cada uno de los componentes ya mencionados anteriormente. La secuencia nucleotídica sintética consiste en: la secuencia señal de reconocimiento para el complejo Sec61 entre los sitios de restricción NcoI y NdeI, la secuencia de Titina entre NdeI y BamHI, luego una secuencia espaciadora entre BamHI y EcoRI, seguido del sitio de clonamiento para la secuencia de cada una de las proteínas plegadas a usar que se mencionan en la **Tabla 1**, entre los sitios de restricción de EcoRI y XbaI y por último la secuencia de histidinas entre XbaI y HindIII.

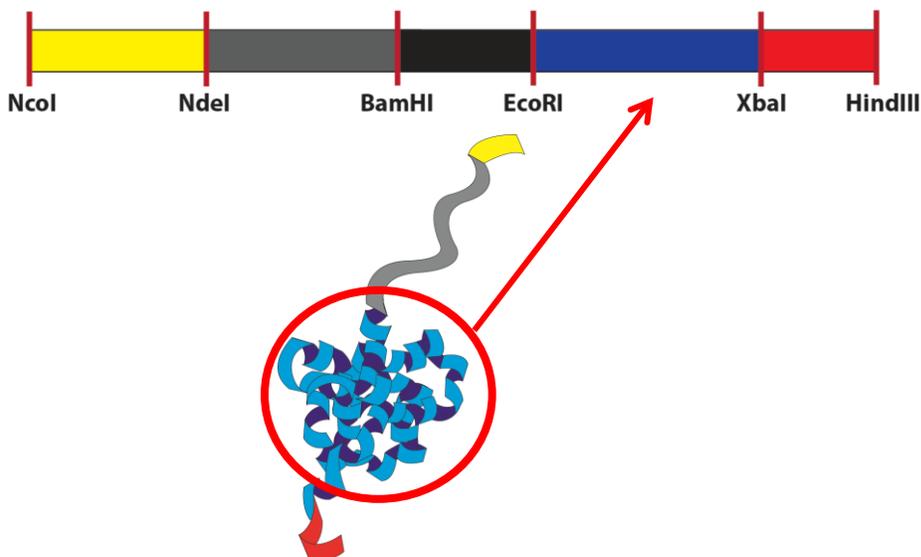


Figure 7.– Secuencia sintética con sitios de restricción para la obtención de las diferentes proteínas quiméricas. El siguiente esquema muestra la secuencia sintética señal con los diferentes sitios de restricción a usar como estrategia para el clonamiento y subclonamiento de cada una de las proteínas en estudio.

Para translocar una proteína desplegada y determinar si la construcción de la proteína quimérica diseñada funciona, un primer control fue realizado con la proteína quimera de Titina desplegada. Específicamente el Dominio I27 de la Titina se mantiene desplegado por la presencia de 2 mutaciones, C47E y C63E en su secuencia. Esta secuencia fue donada por el profesor Mauricio Báez, de la Universidad de Chile (San Martín y cols., 2017). Para evaluar que BiP sea capaz de generar una fuerza mayor a la del valor del baño térmico ($3K_B T$), se escogieron dos proteínas las cuales han sido estudiadas por pinzas ópticas y cada una de estas, posee un valor de fuerza de desplegamiento específico que se encuentran referenciada en la **Tabla 1**. Los plásmidos que contienen la secuencia de la proteína Calmodulina humana (CaM) y Top7 fueron donados por el laboratorio del profesor Carlos Bustamante, de la Universidad de California en Berkeley, EEUU. Como se observa en la **Tabla 1**, Calmodulina posee una baja fuerza de desplegamiento, por lo tanto es la primera aproximación experimental en cuanto al trabajo que pueda ejercer BiP en el caso de que logre translocar y por lo tanto desplegar, la proteína quimera de Calmodulina como sustrato del complejo de translocación Sec61. De esta forma se probará al menos la metodología experimental *in multiplo*. El uso de Top7 fue usado como control negativo ya que posee una alta fuerza de desplegamiento, el cual se encuentra fuera del rango máximo de fuerza que pueda ejercer un motor molecular del tipo *power stroke* descrito en la literatura.

Tabla 1.- Fuerzas de desplegamiento de las diferentes proteínas en estudio, obtenidas por pinzas ópticas.

Proteína	Fuerza de Desplegamiento	Referencias
Titina	0 pN	(San Martín y cols., 2017)
Calmodulina (CaM)	7 pN	(Goldman y cols., 2015)
Top7	30-45 pN	(Goldman y cols., 2015)

4.2.2. - Amplificación de las diferentes proteínas en estudio, para la construcción de las proteínas quimera sustrato para el complejo Sec61, que serán usadas en los ensayos de translocación *in vitro*.

Para el clonamiento de las proteínas de diferentes fuerzas de desplegamiento en la secuencia sintética, fue realizado un PCR convencional para amplificar cada una de ellas, utilizando los partidores que se encuentran en la **Tabla 2**. Estos partidores permiten además añadir los sitios de restricción de EcoRI y XbaI. El PCR para las diferentes proteínas fue realizado para Titina, con una desnaturación inicial a 95°C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de una desnaturación a 94°C por 30 segundos, un apareamiento a 48°C por 30 segundos, una extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 3 minutos. Para CaM 95°C por 2 minutos para la desnaturación inicial, seguido por 30 ciclos de una desnaturación 94°C por 30 segundos, un apareamiento a 62°C por 30 segundos, una extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 3

minutos. Para Top7 95°C por 2 minutos para la desnaturalización, seguido por 35 ciclos de una desnaturalización 94°C por 30 segundos, un apareamiento a 60°C por 30 segundos, una extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 3 minutos, de esta manera los sitios de restricción de EcoRI fue añadido en el extremo 3' y XbaI en el extremo 5'.

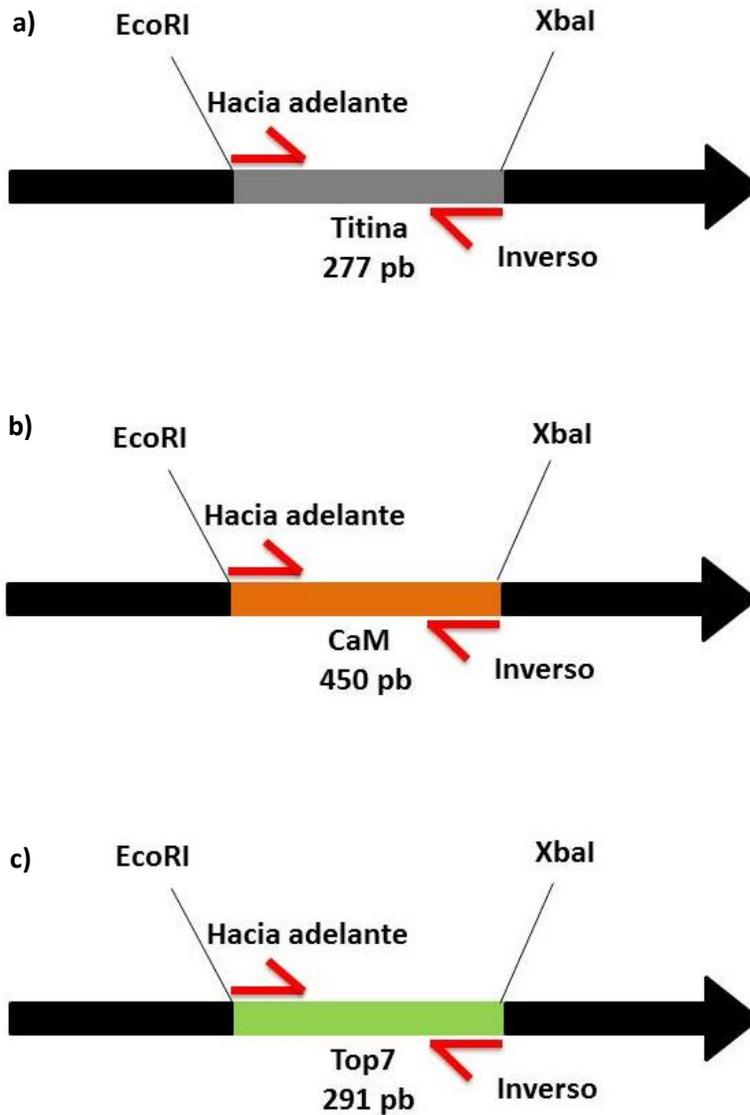


Figure 8.– Sitios de restricción para las diferentes quimeras. a) Construcción de Titina, b) Calmodulina y c) Top7 añadido a cada uno de los partidores para la estrategia de clonamiento y subclonamiento.

Tabla 2.- Secuencia de los partidores para las diferentes proteínas quimeras en estudio con los sitios de restricción de EcoRI y XbaI.

Partidores	Secuencias	Nucleotidos
Sentido	5'- GGAATTCGCTGACCAGCTGACTGAGGA-3'	28
Antisentido	5'- CGTCTAGACTTCGCAGTCATCATCTGG-3'	27
Sentido	5'- GGAATTCCTAATAGAAGTGGAAAAG-3'	25
Antisentido	5'- GCTCTAGACTCTTTCACCTTCAGAT-3'	25
Sentido	5'- GGAATTCGATATTCAGGTGCAGGT-3'	24
Antisentido	5'- GCTCTAGATTCCAGCTGGCCTTCC-3'	24

4.2.3. – Ligación a secuencia sintética de translocación, transformación y extracción de DNA

Los productos de PCR fueron purificados desde un gel de agarosa 0,8% mediante el Kit “QIAquick Gel Extracción” (QIAGEN) según las instrucciones del proveedor. La concentración obtenida fue corroborada mediante absorbancia en un equipo de nanodrop (Tecan). Posteriormente para la ligación de la secuencia de CaM que incluye los sitios de restricción mencionados anteriormente (Figura 8b) 1000 ng/μL del producto purificado del PCR y 1000 ng/μL del vector que contiene la secuencia sintética de translocación fueron digeridos con 5000 unidades (U) de EcoRI y 20 unidades de XbaI, por 1 hora y 30 minutos a 37°C. Posteriormente, los productos de la digestión fueron separados mediante un gel de agarosa 0,8% y purificados mediante el Kit QIAquick Gel Extracción. La cantidad de inserto ligada fue obtenida en base a la fórmula:

$$\underline{\text{masa del vector (ng)+tamaño del inserto (Kb)}} * \text{Razón inserto:vector (molar)} = \text{masa del inserto (ng)}$$

Tamaño del vector (Kb)

La relación usada fue 3:1 (inserto: vector). La reacción fue llevada a cabo con 1X del amortiguador Rapid Ligation (10x), 400 U de la enzima T4 DNA ligasa, 12,05 ng/μL de DNA (CaM) y 4,42 ng/μL de vector que contenía la secuencia sintética de translocación. La ligación fue dejada a 4°C durante toda la noche.

La transformación fue realizada en bacterias quimiocompetentes XL10-Gold mediante el método de Inoue (Inoue y cols., 1990). Para ello, 100 μL de bacterias quimiocompetentes fueron transformadas con 10 μL de producto de ligación, en un tubo eppendorf 1,5 mL. La mezcla fue incubada en hielo durante 20 minutos y luego, fue expuesta a 42°C por 45 segundos, en un baño termorregulado. Finalizado este lapso, fueron adicionados 500 μL de medio Luria-Bertoni (LB; 10 g de bacto peptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de

NaCl, 15 g de agar, para 1L). Para la recuperación de las bacterias, fue realizada una incubación a 37°C durante 90 minutos. Posteriormente, las bacterias transformadas fueron sembradas en placas con medio LB con ampicilina (1000X, concentración stock 100 mg/mL Sigma-Aldrich) incubadas a 37°C durante 16 horas. Las colonias crecidas fueron seleccionadas para una extracción de ADN plasmidial. Se inoculó una colonia en un tubo con 5 mL de medio LB- amp (50 µg/mL). Luego de 16 horas de incubación a 37°C, los tubos, conteniendo 5 mL de cultivo con bacterias, fueron centrifugados a 1780 g por 15 minutos. Posteriormente, la extracción plasmidial fue realizado con un Kit de extracción QIAprep Spin Miniprep Kit. Las concentraciones fueron obtenidas mediante Nanodrop (Tecan), y para corroborar el clonamiento y subclonamiento fueron realizadas mediante la digestión del DNA proveniente de las colonias con las enzimas de restricción de NcoI y HindIII. El tamaño de las bandas esperadas fue previamente analizado por el programa Vector NTI. Para el subclonamiento dirigido con NcoI y HindIII en el vector de expresión pET21d fue mediante la digestión de 2000 ng/µL de DNA proveniente de una colonia única positiva de CaM en el plásmido que contiene la secuencia sintética de translocación con 20000 U de HindIII y 10000 U de NcoI. Posteriormente fueron separados mediante un gel de agarosa 0,8% y luego purificados mediante el kit QIAquick Gel Extracción. La ligación fue realizada posteriormente con 4 ng/µL del DNA purificado luego de la digestión de la secuencia sintética con CaM y con 5,2 ng/µL del DNA del vector pET21d. La reacción fue llevada a cabo a 4°C por 16 horas.

Posteriormente una mutación sitio dirigida fue realizada para cambiar un nucleótido (G → A) para que de esta forma quedara el aminoácido correcto (Arginina) en la secuencia señal. La mutación fue realizada con el KitChange II site-Directed Mutagenesis Kit, como se indica en este, sin embargo la reacción fue realizada por 16 ciclos y las bacterias quimiocompetentes usadas fueron las XL-10 Gold. La secuenciación fue realizada a través de la empresa comercial Sequetech (CA, EEUU). De la misma manera fueron obtenidas las otras ligaciones desde el producto de PCR de Titina y Top7 para el subclonamiento en el vector final de expresión pET21d.

4.2.4.- Expresión y purificación de las proteínas quimeras

Cada una de las proteínas quimeras contiene 6 histidinas en el C-terminal para poder purificar mediante columna de afinidad de Níquel. La proteína quimera de CaM, fue expresada en bacterias SecY^{ts}, donada por el Dr. Greg Payn de la Universidad de California, Los Ángeles. Esta cepa contiene una mutación termosensible en el canal SecY por el cual se secreta la proteína hacia el periplasma. Esta mutación no permite que la proteína sea exportada a altas temperaturas (42°C) y de esta forma su secuencia señal no es

cortada (Lecker y cols., 1989), ya que se requiere la proteína con la secuencia señal completa para que pueda ser reconocida por el complejo Sec61 en los experimentos de translocación *in vitro*.

La purificación de cada una de las proteínas quiméricas de Titina, CaM y Top7 fueron obtenidas mediante un crecimiento con medio LB utilizando 100 µg/mL ampicilina como medio de selección, a 30°C y agitación constante a 220 rpm., durante toda la noche, obteniéndose un pre-inóculo saturado. Posteriormente en 1L de medio LB, fue crecida la cepa que expresa cada una de las proteínas quiméricas, el cual fue iniciado en un OD₆₀₀=0.1. Cuando el crecimiento se encontraba en OD₆₀₀= 0,7.

En primera instancia para la proteína CaM, la inducción fue realizada con 1 mM de isopropyl-β-Dthiogalactopyranoside (IPTG), posteriormente 0,5 mM de IPTG fue usado en la segunda purificación de CaM para obtener mejores rendimientos, siendo esta la concentración de IPTG usada para las otras quimeras de Titina y Top7. Luego la inducción fue realizada por 4 horas con IPTG a 42°C. Una centrifugación durante 20 minutos a 440 x g (Sorvall, rotor GSA) fue realizada para cosechar las células que fueron inducidas. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 15 mL de amortiguador de sonicación. En primera instancia, para CaM fue usado un amortiguador de sonicación que contenía calcio, 50 mM Hepes pH 7,4, 150 mM KCl, 0,5 mM CaCl₂, 10 mM Imidazol referenciado por Goldman y cols., (2015). Posteriormente para la segunda purificación fue realizada sin calcio: 50 mM Hepes pH 7,4, 150 mM KCl, 10 mM de Imidazol. Para Titina y Top7 las condiciones fueron mantenidas para los ensayos utilizando las mismas sales sin calcio, y a Titina se incluyó urea para mantenerla desplegada. Por lo tanto para Titina: 50 mM Hepes pH 7,4, 150 mM KCl, 10 mM de Imidazol, 6 M Urea; para Top7: 50 mM Hepes pH 7,4, 150 mM KCl, 10 mM de Imidazol. Cada una de las purificaciones fueron realizadas mediante cromatografía de afinidad por columna de níquel (His Trap HP 1 mL, General Electric) como en protocolo publicado (Ramirez y cols., 2017) usando un gradiente de imidazol de 10 mM a 250 mM para la elución de cada una de las proteínas, colectando fracciones de 1mL. Para la purificación de la proteína PpαF se utilizó el método del grupo de Meyer (Bush y cols., 1991).

4.2.5.- Extracción de Microsomas por el método de Schekman

La extracción de microsomas desde *S. cerevisiae*, fue llevado a cabo de acuerdo al protocolo de Lyman y Schekman, denominado como método de Schekman (MS; Lyman & Schekman, 1995). En paralelo fue diseñado un método que combina dos técnicas por el cual los microsomas también pueden ser extraídos. Este es uno mejorado desde el método Parodi (MP) que consiste en obtener primero una fracción microsomal (Fernandez y cols., 1994), posteriormente se le añadió la última etapa de purificación del MS, que consiste en

un gradiente de sacarosa que por densidad luego de una centrifugación diferencial se obtienen los microsomas. Este nuevo método resulta ser más barato, rápido y toma menos tiempo en la preparación a diferencia del MS en que se deben preparar varias soluciones de amortiguadores, además de la preparación de la enzima liticosa con una buena actividad. Además al agregar la última etapa del MS, nos quedan microsomas más puros.

Para el método de Schekman, un pre-inóculo de levaduras de 50 mL fue dejado durante toda la noche en medio YP (1% de extracto de levadura Bacto, 2% de peptona) más 2% de dextrosa (YPD), las cuales fueron crecidas en un agitador a 30°C y 180 rpm. Al siguiente día el cultivo se encontraba saturado, y 6 L de medio YPD fueron inoculados inicialmente a una densidad óptica de 0,2 a 600 nm, a 30°C y 180 rpm toda la noche. Posteriormente cuando el cultivo contenía una densidad óptica de 7 a 600 nm, las células fueron cosechadas, a 4400 x g por 20 minutos a 4°C. El peso de la pella fue obtenido restando el peso de la botella antes de la centrifugación y luego de haber centrifugado y eliminado todo el sobrenadante. La pella, fue resuspendida con 150 mL de 100 mM de Tris, pH 9,4 y 10 mM DTT, obteniéndose 40 OD/mL. Posteriormente fue incubado por 10 minutos a temperatura ambiente con una baja agitación (aproximadamente 70 rpm). Las células nuevamente fueron centrifugadas a 4400 x g por 10 minutos y luego fueron resuspendidas con 150 mL de amortiguador de liticosa (0,7 M de sorbitol, 0,75X YP, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT) obteniendo 40 OD/mL. Para digerir la pared celular y preparar los esferoplastos (levadura sin pared celular), 40 unidades de liticosa por OD fueron añadidas e incubadas a 30°C en un agitador con agitación lenta (aprox. 70 rpm) por 30 minutos.

Los esferoplastos fueron centrifugados a 4400 x g por 5 minutos a 4°C, y resuspendido por 100 OD/mL en amortiguador 2xJR (0,4M sorbitol, 100 mM KOAc, 4 mM EDTa, 40 mM HEPES pH 7,4, 2mM DTT y 2 mM PMF). Luego los esferoplastos fueron centrifugados otra vez a 4400 x g por 5 minutos a 4°C y resuspendidos a 400 OD/mL en amortiguador 2xJR y guardados a -80°C. Al siguiente día, los esferoplastos fueron descongelados y añadidos un cóctel de inhibidores de proteasas y poder reductor (3 mM DTT, 3 µg/mL de leupeptina y 1 mM de PMSF) en hielo. La ruptura celular fue realizada de forma manual con un Potter Elvehjem (alrededor de 10 veces) en hielo. Luego una centrifugación a 1070 x g por 5 minutos a 4°C para separar la células rotas que forman una pella del sobrenadante. El sobrenadante fue colectado y nuevamente una centrifugación a 26700 x g por 10 minutos a 4°C obteniéndose una pella que corresponde a una fracción microsomal (microsomas no puros). La pella fue resuspendida en amortiguador B88 (20 mM HEPES, pH 6,8, 250 mM sorbitol, 150 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)). Posteriormente la fracción microsomal fue añadida a un gradiente de sacarosa (20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM KOAc, 2 mM EDTA y sacarosa en 1,2 o 1,5 M de sacarosa). Finalmente una ultracentrifugación a 194000 x g (Beckman Optima, EEUU) por 1 hora y 4°C fue

realizado. Las membranas microsomales fueron colectadas desde la interface del gradiente de sacarosa 1,2/1,5 M y resuspendidas con el amortiguador de B88 y una centrifugación a 26700 x g fue realizada por 10 minutos a 4°C. Finalmente, las membranas fueron resuspendidas en amortiguador B88, y la concentración fue chequeada midiendo la Absorbancia a 280 nm (Abs_{280}). Los microsomas fueron alicuotados en tubos Eppendorf con un volumen de 100 μ L ya que deben ser descongelados al menos 2 veces para cada experimento, esto debido a que pueden perder funcionalidad al ser descongelado reiteradas veces, además son mantenidos a -80°C.

4.2.6.- Funcionalidad de los microsomas obtenidos

Para corroborar que la extracción de microsomas haya sido exitosa, se corroboró la presencia de cada una de las partes que componen al translocon Sec61 como se muestra en la **Figura 9**. El método de detección fue realizado mediante ensayos de electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado (Western Blot) usando un anticuerpo específico contra Histidina o contra las proteínas quimeras en particular. En detalle, las proteínas quimeras presentes en los ensayos de translocación se separaron por su peso molecular en geles de poliacrilamida al 12% usando el sistema de electroforesis en geles *Mini-Protean III* (Bio-Rad). Las muestras se corrieron a 100 V constantes en tampón de corrida 1x (1,44% glicina; 0,3% Tris; 0,1% SDS). La transferencia de las proteínas desde los geles de poliacrilamida hacia membranas de nitrocelulosa (Millipore) se realizó usando el sistema *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad). Posteriormente, se llevó a cabo la transferencia durante 90 minutos a 90V en tampón de transferencia 1x (1,44% glicina; 0,3% Tris; 20% metanol). La membrana se bloqueó mediante su incubación en una solución de 5% de leche sin grasa (Svelty) en amortiguador TBS (50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl) durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación lenta. Luego la membrana fue incubada a 4°C durante toda la noche en un mini rocker (agitador) con los diferentes anticuerpos primarios (todos ellos donados por el laboratorio del Dr. Randy Schekman de la Universidad de California en Berkeley) contra cada una de las proteínas de interés en la misma solución de bloqueo (Se usó anti-Sec61 una concentración de 1:5000 anti-Sec63 1:10000; anti-Sec72 1:500; anti-BiP 1:10000). Después de 3 lavados con una solución de TBS-Tween 0,1%, la membrana se incubó con agitación a temperatura ambiente por 1 hora con una solución de anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución de 1:3000 en TBS-Tween 0,1%. Para la inmunodetección se usó el reactivo *Supersignal West-Femto* (Pierce Biotechnology, Inc), un sustrato utilizado por la enzima HRP que genera una señal quimioluminiscente. Las imágenes se obtuvieron usando el sistema de captura y análisis de imágenes *Dyversity 4* (Syngene).

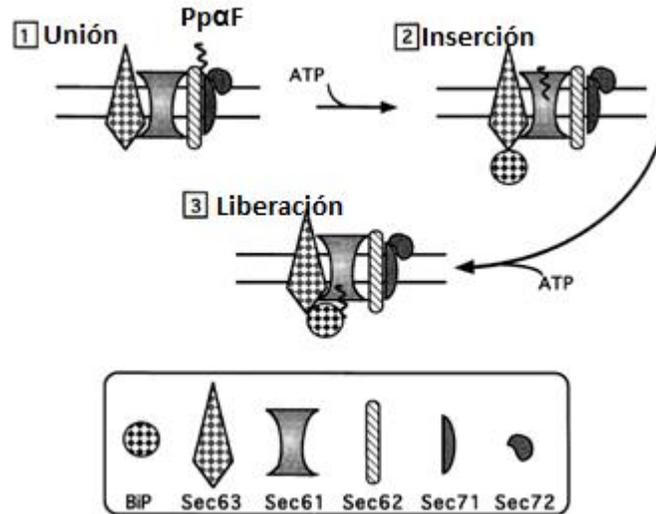


Figura 9.- Translocón de *S. cerevisiae*. La imagen muestra las subunidades que comprende el Translocón Sec61, (imagen adaptada al español) (Lyman & Schekman, 1997).

Un ensayo de traducción *in vitro* con Metionina radioactiva fue realizado para obtener como sustrato de translocación PpαF radioactiva. Este ensayo se llevó a cabo como es mencionado en (Lyman & Schekman, 1997).

4.2.7.- Ensayos de translocación *in vitro*

Los ensayos de translocación fueron realizados como en protocolo Lyman & Schekman (1995) que consiste principalmente en una incubación de los microsomas con la proteína quimera que será el sustrato del complejo Sec61. Este ensayo se basa en observar a través de geles de poliacrilamida la protección dada por el microsoma de las proteínas que translocan. Un ensayo de protección en que una enzima, Tripsina corta toda la proteína que haya quedado por fuera del microsoma. Por último un control con Tritón y Tripsina. Tritón es un detergente que desarma las membranas del microsoma y tripsina puede cortar toda la proteína. De esta forma se puede determinar cuanto proteína logra entrar al microsoma calculando el porcentaje de translocación *in vitro*. La preparación del ensayo fue realizada con 2,15 mg/mL de microsomas, 1X de una solución de 10X ATP (10X ATP: 10 mM ATP, 400 mM creatina fosfato, 2 mg/mL creatina fosfoquinasa en B88), B88 1X (20 mM HEPES pH 6,8, 150 mM KOAc, 250 mM sorbitol y 5 mM MgAc), 50 μM de GDP-manosa, 3 μM de cada una de las proteínas en estudio y para PpαF 3 μM o 1,5 μM. Para el ensayo de protección con 0,29 mg/mL de Tripsina y 0,89% de Tritón. Otros ensayos, fueron realizados con 5 mM de EDTA para quelar el calcio y 1 M urea para conseguir desplegar la proteína de CaM y así corroborar que la proteína tenga la secuencia señal y pueda ser capaz de entrar hacia dentro del microsoma comprobando la funcionalidad de esta quimera.

El método de detección fue realizado mediante ensayos de electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado (Western Blot) como es mencionado anteriormente (en Funcionalidad de los microsomas obtenidos), se usó un anti-histidina a una concentración de 1:1000; anti-CaM 1:3000 y anti-PpαF 1:1000. Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas por el programa imageJ y el porcentaje de translocación fue obtenido mediante el análisis de los pixeles de las diferentes intensidades de Bandas obtenidas mediante el software image J.

5.- RESULTADOS

5.1.- Objetivo específico 1: Diseñar y producir proteínas quimeras sustrato para el complejo Sec61 con diferentes fuerzas de desplegamiento que serán usadas en ensayos de translocación *in vitro*.

5.1.1.- Subclonamiento de la secuencia nucleotídica sintética de translocación con las diferentes proteínas plegadas en estudio (Calmodulina, Titina y Top7) en el plásmido de expresión pET21d.

La secuencia nucleotídica correspondiente a Calmodulina (CaM), logró ser amplificada utilizando partidores diseñados específicamente para CaM, conteniendo en sus extremos las secuencias de las enzimas de restricción EcoRI y XbaI. Posteriormente, el clonamiento y subclonamiento en el vector de expresión pET21d con las enzimas de restricción NcoI y HindIII logró ser obtenido mediante la digestión del ADN de las colonias obtenidas, observando las bandas esperadas de 866 pb y 5379 pb mediante el programa bioinformático Vector NTI, cuya estrategia nos permitió seleccionar las colonias positivas (**Figura 10**). Posteriormente una Mutación sitio dirigida fue realizada para cambiar un nucleótido (G → A) para que de esta forma quedara el aminoácido correcto (Arginina) en la secuencia señal. Esta mutación es fundamental para la translocación ya que este aminoácido cargado positivamente en el N-terminal de la proteína le permite interactuar mejor con el canal Sec61 (Shao & Hegde, 2011). Luego de la mutación, la secuencia fue comparada con la predicción de la construcción de CaM, mediante un alineamiento múltiple usando el software AlignX. El alineamiento obtenido de la secuencia fue de un 100% de identidad. Estos resultados indican la obtención de la secuencia nucleotídica completa de la proteína quimera CaM, que corresponde en secuencia señal, Titina desplegada, CaM y cola de histidina. La obtención de las demás construcciones tal como la proteína quimera de Titina usado como un control positivo y Top7 como un control negativo del ensayo fueron obtenidos como es mencionado en esta sección con CaM y en metodología.

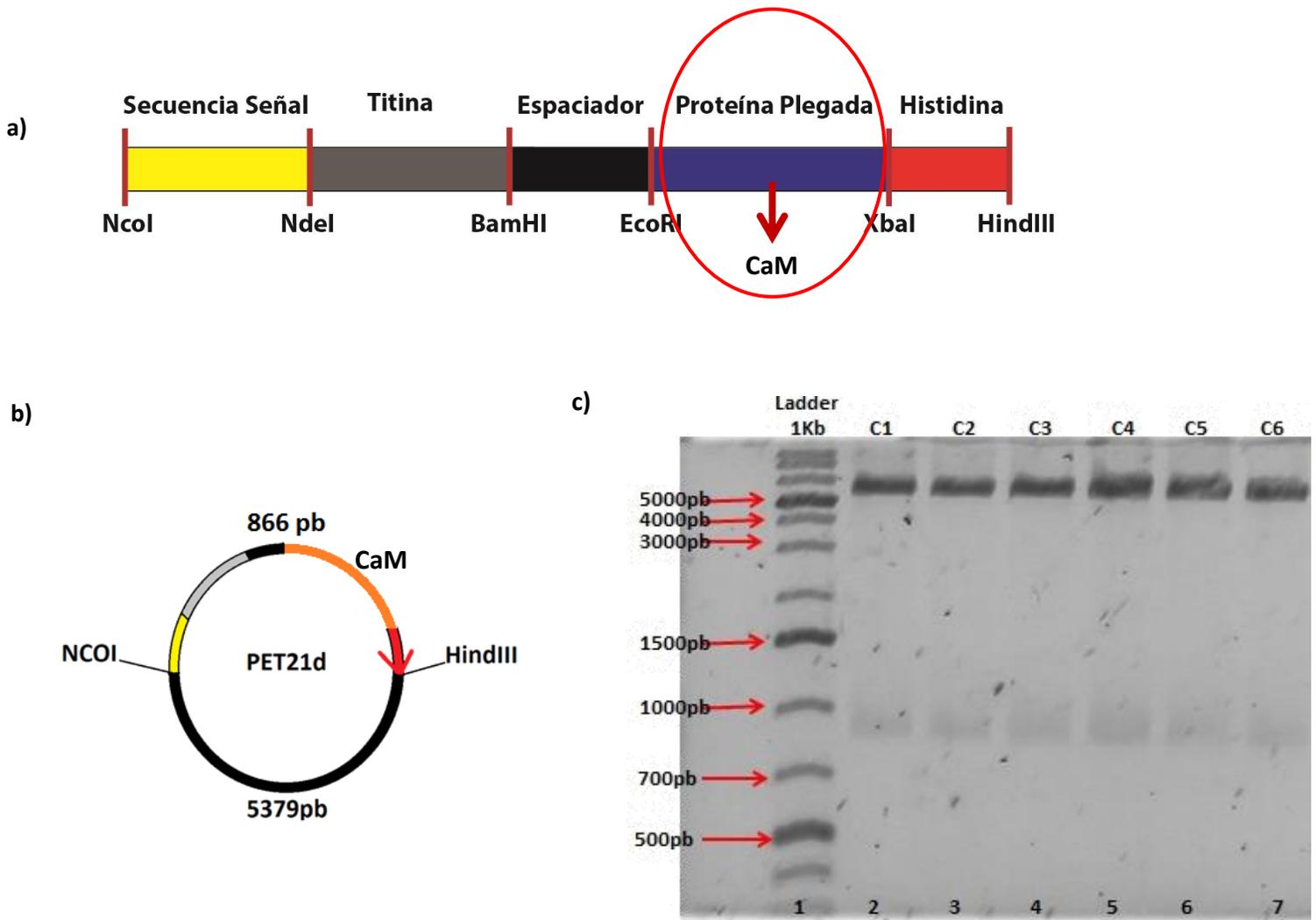


Figura 10.- Colonias positivas del subclonamiento de secuencia nucleotídica sintética de translocación con CaM en el plásmido de expresión pET21d. En **a)** un esquema general en que se observan las diferentes partes que contendrá la proteína quimera CaM a clonar con las diferentes enzimas de restricción, que son señaladas en el esquema. En **b)** un esquema de las bandas esperadas de 866 pb y 5379 pb mediante programa informático Vector NTI. En **c)** se observa el ADN proveniente de 6 colonias positivas que fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y HindIII, se observan las 2 bandas esperadas de 6245pb y 866pb en un gel de agarosa 0,8% teñido con Gel Red.

5.1.2.- Expresión y purificación de las proteínas quiméricas de CaM, Titina y Top7

La expresión de la proteína quimera CaM, logró ser obtenida desde bacterias quimio-competentes SecY^{ts} las cuales habían sido transformadas con el plásmido de expresión pET21d. Mediante las diferentes fracciones obtenidas, observadas en un gel con tinción Azul de Coomassie en **Figura 11** se muestra que la purificación no fue tan eficiente, ya que se observa varias otras proteínas que se quedan retenidas en la columna de níquel. Esto puede deberse que al estar tratando de sobre-expresar una quimera que contiene una proteína plegada y una parte desplegada, puede ocurrir que esta forme cuerpos de inclusión y muy poca proteína esté en solución. A medida que las fracciones se van limpiando, se observa una banda cercana a los 35 kDa la cual podría corresponder a la proteína quimera CaM. Posteriormente, para corroborar o descartar la presencia de la proteína quimera CaM, fue realizada una electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado (**Figura 12**).

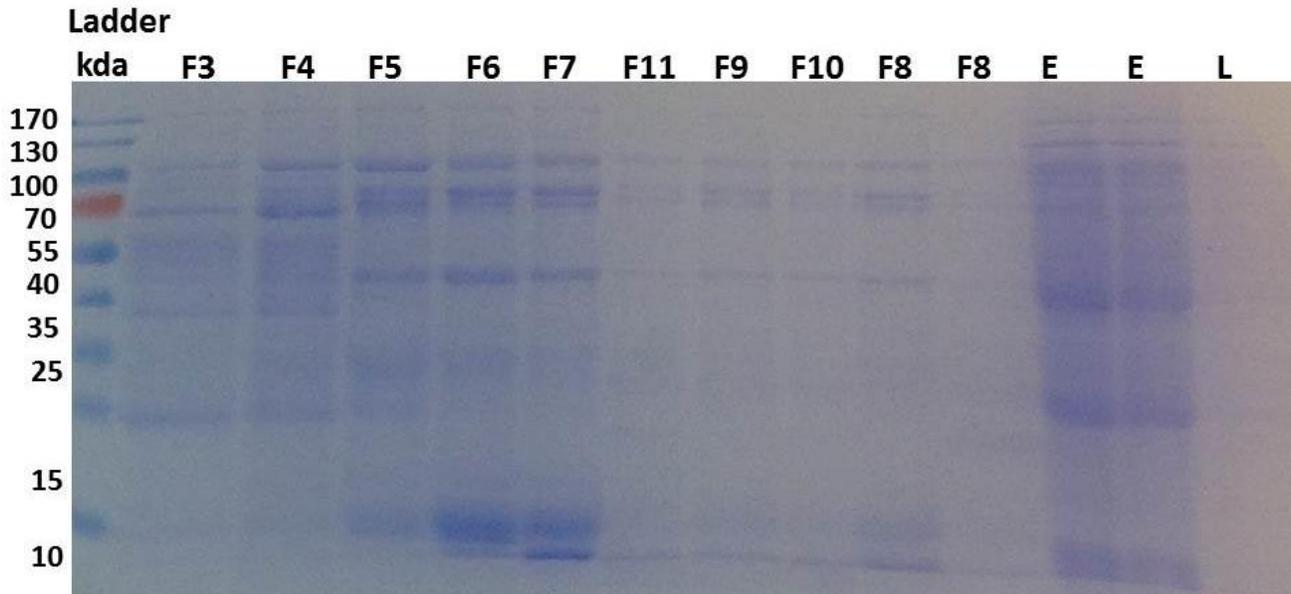


Figura 11.- Fracciones obtenidas de la purificación de CaM por columna de Níquel. Se presentan las fracciones obtenidas en la purificación. Veinte μ L de muestra fueron cargados en cada uno de los pocillos, E corresponde al Eluido y L al lavado. Gel SDS 12,5%.

Usando los anticuerpos específico para CaM e Histidina, se logró determinar bandas que fueron reconocidas por el anticuerpo de CaM una en los 35 kDa, 25 kDa y una de 15 kDa (**Figura 12**).

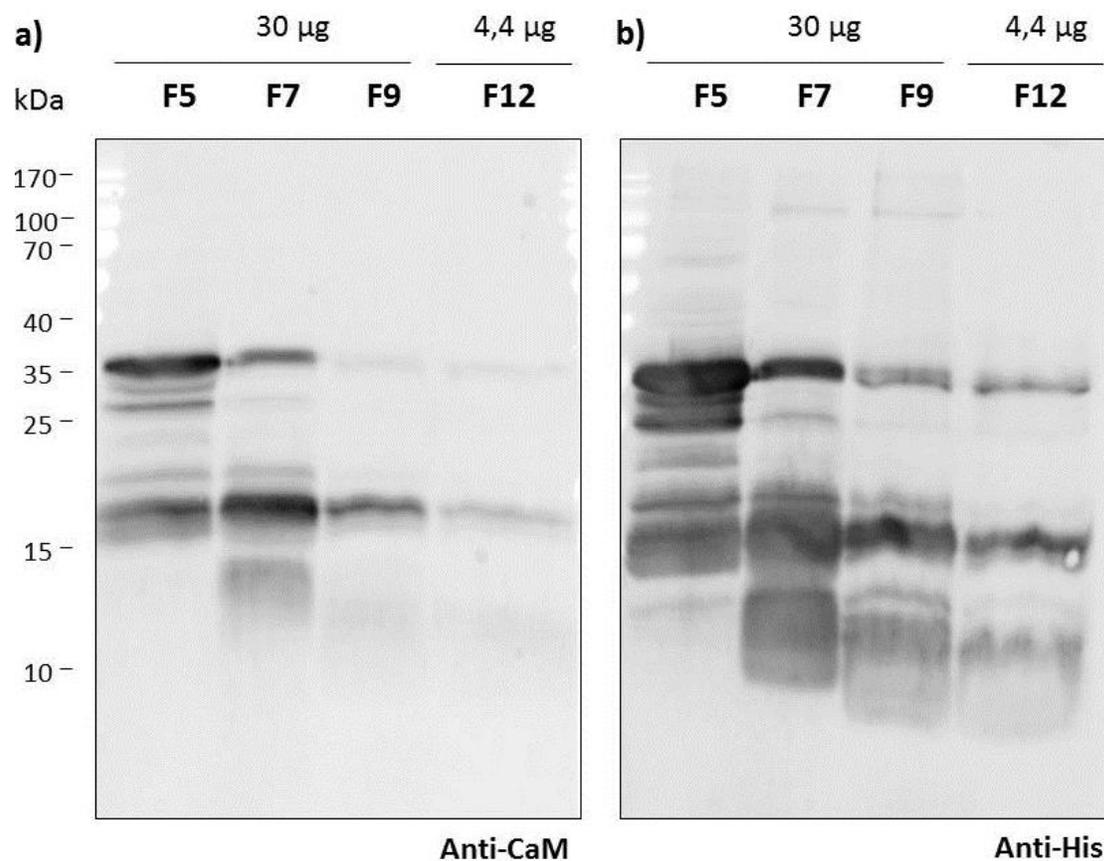


Figura 12.- Western Blot de las fracciones obtenidas en la purificación de CaM por columna de Níquel. Las fracciones F5, F7, F9 y F12 fueron analizadas para corroborar la presencia o ausencia de la proteína quimera CaM usando dos anticuerpos específicos. En figura **a)** y **b)** se cargó la misma concentración de proteína (30 µg) en las fracciones F5, F7, F9, y se cargó menos en F12 (4,4 µg) ya que esta se encontraba más diluida. En **a)** se usó un anti-CaM, 1:3000 y en **b)** se usó un anti-His, 1:1000. Revelado fue realizado con ECL.

La banda de 35 kDa es distinta a lo calculado teóricamente (32 kDa a través de análisis de secuencia), esto puede deberse a las distintas interacciones que puedan tener algunos residuos con el SDS (Rath y cols., 2009). Las bandas más pequeñas podrían sugerir que la proteína podría estar siendo proteolizada. Para tener certeza de la presencia de la proteína quimera CaM, fue realizado un análisis de espectrometría de masas (Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile) para las distintas bandas, que fueron cortadas desde el gel con tinción Azul de Coomassie (**Figura 13**).

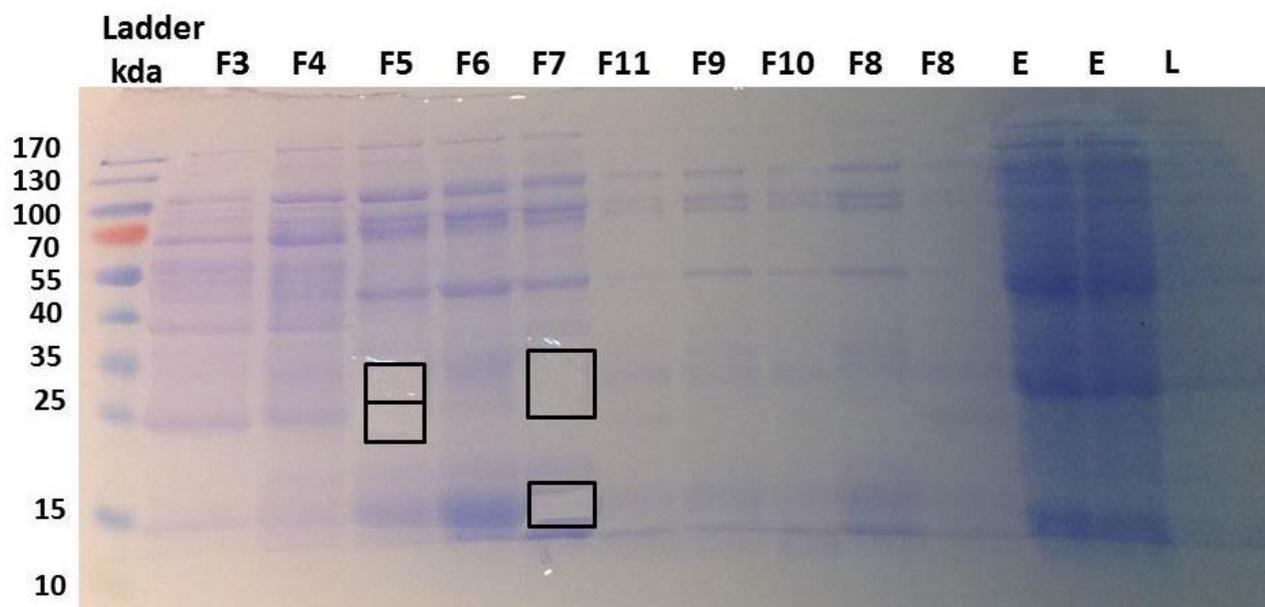


Figura 13.- Fracciones obtenidas de la purificación de CaM por columna de Níquel. Se enmarcan las bandas que fueron analizadas por espectrometría de masas. En la fracción 5 las bandas de 35 kDa y 25 kDa por separado; en la fracción 7, las bandas de 35 kDa y 25 kDa juntas. E (Eluido) y L (Lavado), y otra de 15 kDa. Gel SDS 12,5%.

Los resultados de la espectrometría de masas (**Tabla 3**), sugieren que las muestras analizadas corresponderían a mezclas de proteínas y que la proteína de interés estaría en base a la cobertura de secuencia y a la masa molecular calculada en la muestra banda F5 de 35 kDa. Por lo tanto, se obtuvo una fracción enriquecida con la proteína quimera CaM. Además se hizo cortes proteolíticos de la muestra con tripsina y se identificó claramente la proteína CaM, obteniéndose un 31% de cobertura.

Tabla 3.- Señales m/z experimentales versus teóricas

Muestra	Matriz	Figura	Cobertura
Banda F5 35 kDa	CHCA	7A	31%

Posteriormente una columna de exclusión molecular fue usada para poder separar la banda de 35 kDa correspondiente a la proteína quimera CaM. Luego se realizó un Bradford cualitativo a cada una de las fracciones obtenidas, no observándose algún cambio en la coloración (Azul indicativo de presencia de proteína), concluyendo que la proteína estaba demasiado diluida. Por absorbancia a 280 nm se observaron principalmente dos picos los cuales podrían corresponder a las fracciones de proteína. Para corroborar esto se realizó un Western Blot. Para el Western Blot, primero cada una de las fracciones fue concentrada. Sin

embargo, el Western Blot no salió como se esperaba ya que no se observó estándar de proteínas, sin embargo, se logró observar una banda que podría corresponder a la banda de 35 kDa. Como último paso, todas las fracciones fueron juntadas para ser concentradas en tubos Amicon de 3 K (15 mL) obteniendo un volumen de 500 μ L. Posteriormente se realizó Western Blot y no se logró observar la banda de 35 kDa que corresponden a la proteína quimérica CaM, por lo que se concluye que la proteína pudo haberse degradado. Finalmente para cumplir completamente este objetivo se mejoró el rendimiento de la obtención de la proteína (como se explica más abajo). De todos modos, se guardó muestra de la fracción enriquecida de la proteína quimera CaM para realizar un ensayo preliminar de translocación, que se describirá en el objetivo número 3.

Luego una segunda purificación de la proteína quimérica CaM fue realizada como se menciona anteriormente. Sin embargo, esta vez fue purificada sin calcio (amortiguador usado fue 50 mM Hepes pH 7,4, 150 mM KCl), debido a que se ha visto que el calcio afecta la translocación al interactuar con Calmodulina y la secuencia señal y también podría interferir con la purificación en columna de níquel por su carga +2 (Shao & Hegde, 2011). Es importante mencionar que cuando la proteína CaM está en ausencia de calcio su fuerza de desplegamiento es menor (Junker *et al.*, 2009). Se obtuvo una concentración de 141,9 μ M en un volumen aproximadamente de 500 μ L. Esta concentración es mayor que la obtenida anteriormente, lo cual puede deberse a que se usó esta vez 0,5 mM de IPTG en vez de 1 mM de IPTG para inducir las células, además de no utilizar calcio. Al usar 1 mM de IPTG para inducir la expresión de proteína se observó un OD₆₀₀ menor a las 4 horas de inducción que con 0,5 mM de IPTG. Esto podría indicar que altas concentraciones de IPTG podría ser un poco tóxica para la célula y se obtiene menos proteína en solución. Por otra parte, durante la purificación fueron agregados inhibidores de proteasas en el paso de la gradiente ya que observamos anteriormente al tratar de separar por la columna de exclusión molecular que la proteína se perdía, además de tener más cuidado en mantener todo muy frío en todas las etapas. Para descartar que la mayor parte de proteína se encontrara en cuerpos de inclusión, un poco de pella fue guardado luego de la sonicación de las células y posteriormente fue comparado con la obtención de la purificación mediante un gel SDS PAGE como se muestra en la **Figura 14**. Como se observa en la Figura 14, existe proteína quimera CaM en la pella, pero una gran cantidad en la fracción soluble (quimera CaM purificada).

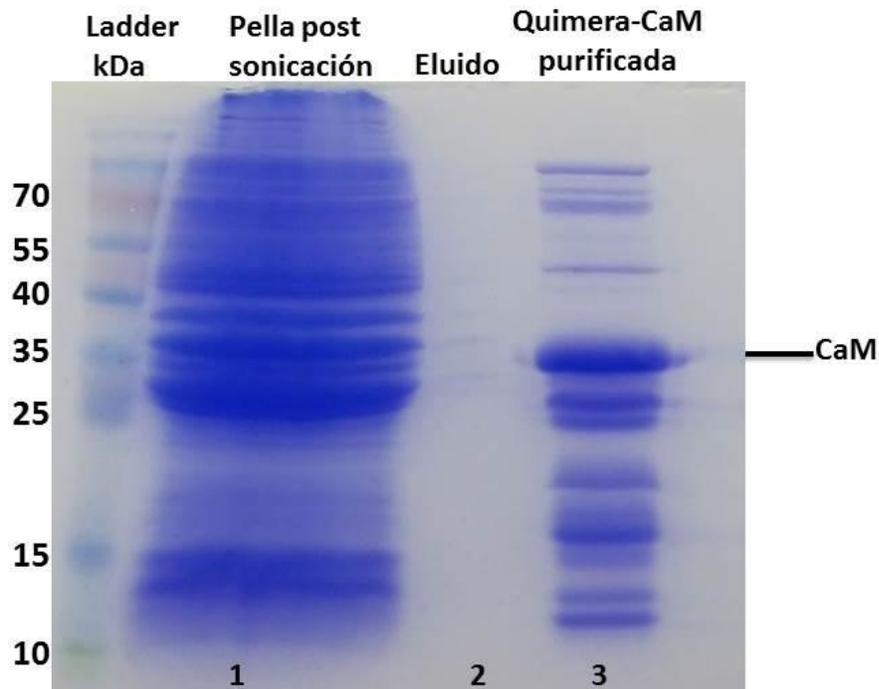


Figura 14.- Comparación de la obtención de la Quimera-CaM purificada sin Ca^{+2} versus el pella post-sonicación. Se muestran las bandas obtenidas luego de la sonicación de la pella, posteriormente de la purificación por columna de His-Tag. La proteína quimera CaM corresponde a la banda de 35 kDa. Gel SDS 12,5% con tinción Azul de Coomassie.

Posteriormente las otras proteínas purificadas de manera similar a la quimera CaM que fueron usadas como controles del ensayo se observan en la **Figura 15**. Pp α F se observa más pura que las otras proteínas ya que esta purificación se encuentra muy bien estandarizada en el laboratorio, además se ha visto que Titina suele ser degradada por la célula (San Martín y cols., 2017).

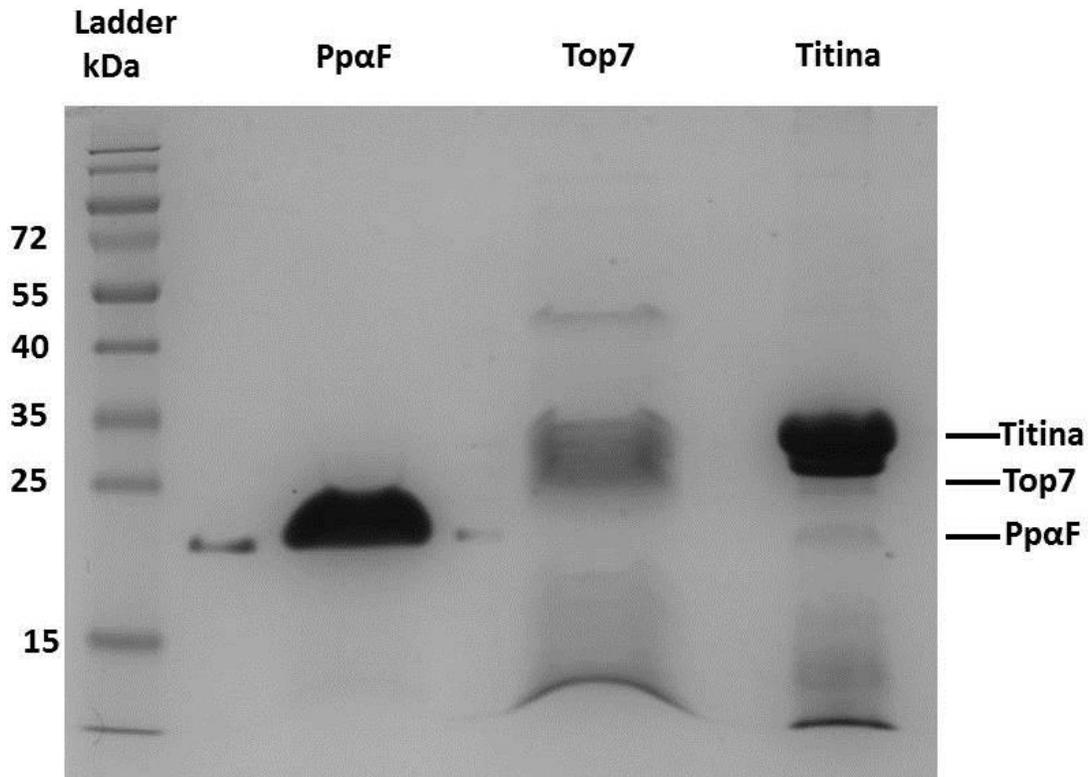


Figura 15.- Proteínas purificadas usadas como control positivo PpαF, proteína quimera de Titina y control negativo Top7. Se muestran las bandas obtenidas luego de la purificación de PpαF correspondiente a la banda de 19 kDa, Titina es observada alrededor de los 25 kDa y Top7 alrededor de los 24,5 kDa. Gel SDS 12,5% con tinción Azul de Coomassie, imagen tomada en el equipo Syngen.

5.2.- Objetivo específico 2: Obtener microsomas para ensayar la translocación de las proteínas con diferentes fuerzas de desplegamiento.

5.2.1.- Extracción de Microsomas.

La extracción de microsomas desde *S. cerevisiae*, fue realizado de acuerdo al protocolo de Lyman & Schekman (1995), denominado como método de Schekman (MS). En paralelo se utilizó un método diseñado en nuestro laboratorio, que combina las dos técnicas, el método Parodi (MP) que consiste en obtener primero una fracción microsomal (Fernandez y cols., 1994). Posteriormente a este método se le añadió la última etapa de purificación del MS, que consiste en un gradiente de sacarosa 1,2M y 1,5 M en donde por densidad luego de una centrifugación diferencial, se obtuvieron microsomas. Este es un nuevo método combinado de Parodi-Schekman (PS; **Figura 16**). El rendimiento de Microsomas obtenido desde 1 L de cultivo por MS fue de 1,9 mg/mL y por PS desde 1 L de cultivo fue de 2,8 mg/mL resultando ser un 46% mayor al ser comparado con MS. Una de las ventajas de esta nueva forma de preparar microsomas, es que resulta ser de bajo costo, es más rápido, ya que toma menos tiempo en la preparación a diferencia del MS en que se deben preparar varias soluciones de amortiguadores, además de la preparación de la enzima liticasa con una buena actividad para degradar la pared celular de la levadura y poder romper la célula.

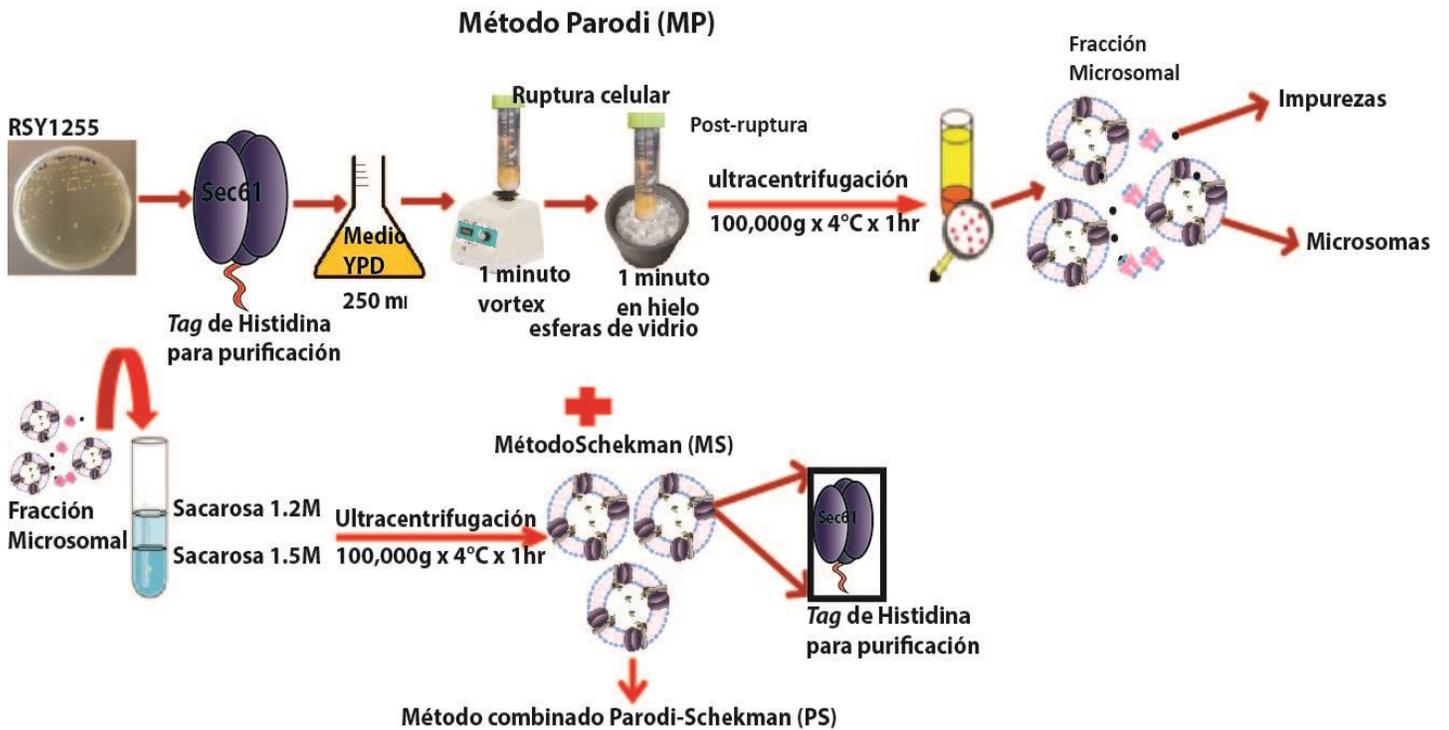


Figura 16.- Esquema de obtención de microsomas purificados por el método combinado Parodi Schekman.

Se muestra de forma general el mejoramiento del método. La cepa de levadura (RSY1255) que contiene el complejo Sec61 sobre-expresado y que a la vez contiene una cola de histidina para la purificación es usada para la obtención de microsomas. La cosecha del cultivo para la extracción es realizada a partir de 250 mL de medio YPD. Posteriormente se muestra el método mecánico de ruptura celular el que es realizado con esferas de vidrio que tienen un tamaño de 0,5 mm. La ruptura mecánica es realizada durante 1 minuto con vortex y luego 1 minuto en hielo por 10 veces. Posteriormente, por una ultracentrifugación a 100.000 x g se obtiene una fracción microsomal, esta primera parte corresponde al método de Parodi. Luego al método Parodi le es añadido la última etapa del método de Schekman, el cual consiste en añadirle la fracción microsomal a un gradiente de sacarosa que luego de una ultracentrifugación a 100.000 x g los microsomas purificados son obtenidos.

5.2.2.- Evaluación de la integridad y funcionalidad de los microsomas purificados por el Método combinado Parodi Schekman y por método Schekman mediante radioactividad.

Para corroborar que todas las partes que componen al translocón Sec61 estén presentes, además de la proteína BiP, fue realizado un Western Blot (**Figura 17**). En la **Figura 17** se observan las bandas correspondientes a cada una de las proteínas que componen el complejo Sec61, demostrando la integridad del complejo en el método mejorado PS.

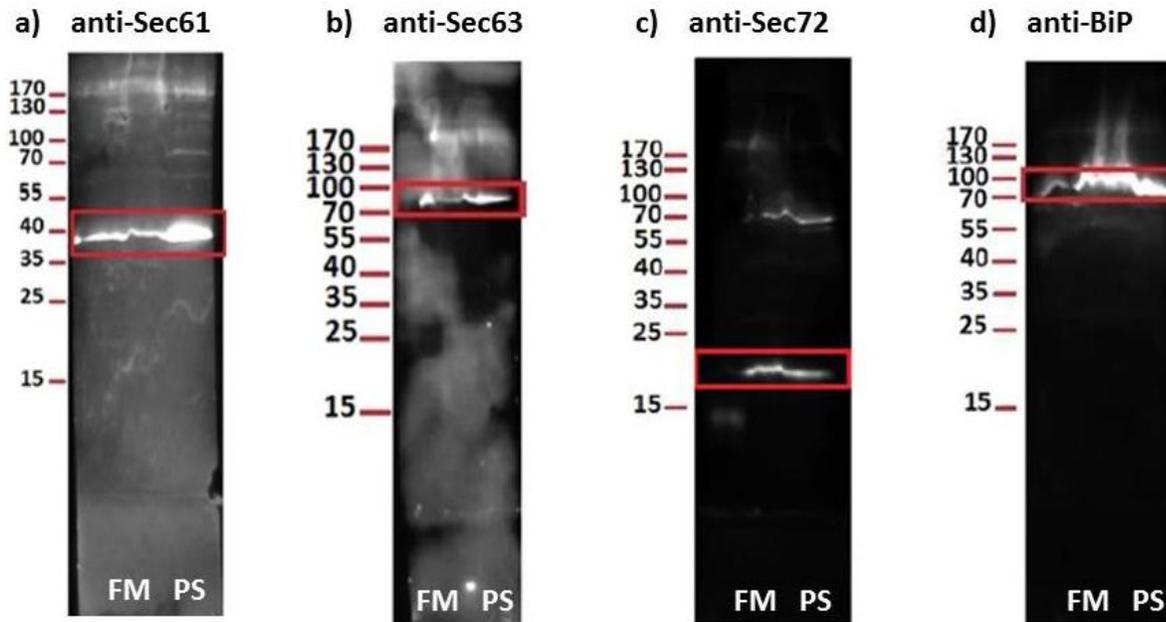


Figura 17.- Western Blot del complejo Sec61. Se usaron diferentes anticuerpos específicos contra cada una de las proteínas que componen el complejo Sec61, en **a)** anti-Sec61 (1:5000) 52,5 kDa, **b)** anti-Sec63 (1:10000) 75,3 kDa, **c)** anti-Sec72 (1:500) 21,6 kDa and **d)** anti -BiP (1:10000) 74,5 kDa. El revelado fue realizado con West Femto.

Para evaluar la funcionalidad de los microsomas, en la literatura ha sido realizado un ensayo de translocación con radioactividad usando como sustrato PpαF radioactiva con ^{35S}Metionina (Lyman & Schekman, 1997). Por lo tanto un ensayo de translocación *in vitro* fue realizado usando los microsomas preparados por MS y método mejorado PS para comparar su funcionalidad (**Figura 18**). El resultado indica que los microsomas por método PS, son funcionales ya que se observa translocación, sin embargo se observa una menor eficiencia de translocación en método mejorado PS (alrededor de 10%) en comparación con MS (alrededor de 24%). Lo importante es que son funcionales y de igual forma para los ensayos *in multiplo*, estos microsomas podrían ser utilizados.

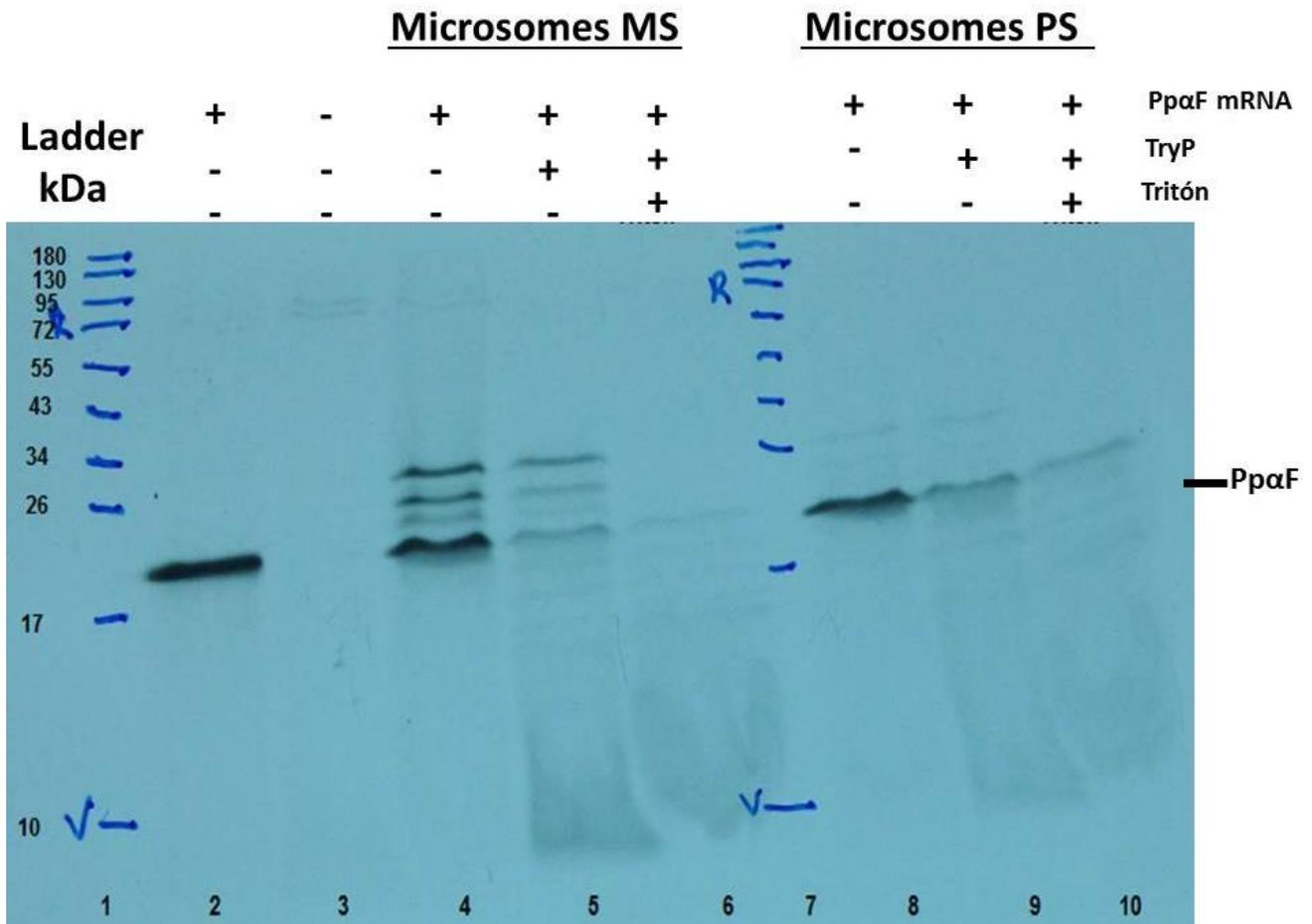


Figura 18.- Ensayo de translocación con microsomas preparados por MS *versus* método combinado PS con PpαF radioactiva. Placa fotográfica desde un gel de poliacrilamida 15%. En cada carril se cargaron 25 μ L de muestra. Carril 1: estándar de peso molecular; carril 2: proteína total PpαF; carril 3: control negativo de PpαF ARNm; carril 3-6: ensayo de translocación con microsomas por MS; carril: 8-10 microsomas por el método mejorado PS. Peso molecular de PpαF: 20 kDa. Exposición del Gel fue de 16 horas en la placa fotográfica.

5.2.3.- Evaluación de la pérdida de BiP en el proceso de purificación de microsomas por el Método combinado Parodi-Schekman.

Se comparó la eficiencia de translocación de PpαF radioactiva de Microsomas obtenidos por el MS *versus* el método combinado PS y se pudo observar claramente una baja en la eficiencia de translocación obteniendo un 24 % en MS y 10 % en PS como se mencionó anteriormente. Se sugiere que esta pérdida de eficiencia de un 43% en la translocación pudiera estar dada por el método de ruptura, el cual puede ser más agresivo (ver metodología) y que esto podría provocar la pérdida de BiP durante el proceso, obteniéndose una menor cantidad dentro del microsoma en el método combinado PS (**Figura 16**). Para ello fue realizado un Western Blot semi-cuantitativo usando un anticuerpo específico para BiP, de esta forma se podría cuantificar la pérdida en el proceso de obtención de microsomas purificados por el método combinado PS. Primero, fue

realizada una curva de calibración de distintas concentraciones de proteína BiP purificada (Ramirez y cols., 2017). Posteriormente se cuantificó la cantidad de BiP en el proceso de post-ruptura celular, además de cuando se obtiene la fracción microsomal y por último después de la gradiente de sacarosa que es donde se obtienen los microsomas purificados (**Figura 16**). También se cuantificó la cantidad de BiP en microsomas MS para comparar la cantidad de BiP *versus* la cantidad de BiP en microsomas desde el método combinado PS, **Figura 19, Figura 20 y Tabla 4**.

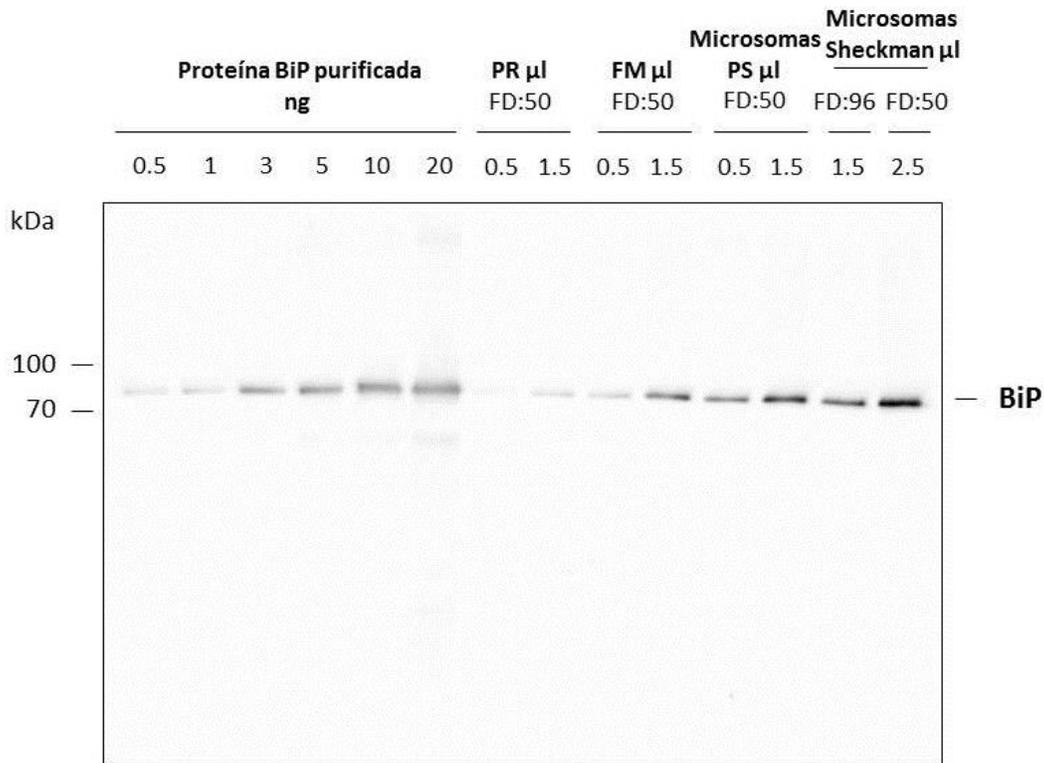


Figura 19. - Cuantificación de proteína BiP por Western Blot en el proceso de obtención de microsomas desde el método combinado Parodi-Schekman. La imagen muestra diferentes concentraciones de proteína BiP y diferentes diluciones de las muestras provenientes desde post-ruptura (PR), fracción microsomal (FM), y microsomas purificados por el método combinado PS y MS. PM: BiP: 74,5 kDa; anti-BiP 1:10000. El revelado fue realizado con ECL.

Tabla 4.- Pixeles obtenidos desde las distintas concentraciones de BiP.

ng de BiP	Área(Pixel) ²
0	0
0,5	4323518
1	4642347
3	13563320
5	18653200
10	27694610

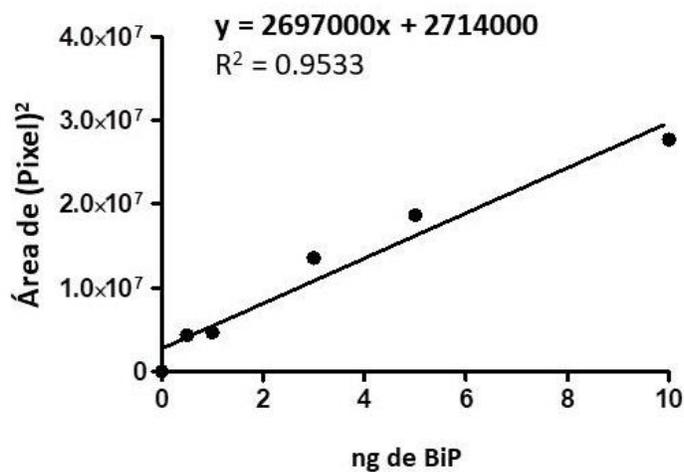


Figura 20.- Curva de calibración de la proteína BiP purificada. Curva estándar obtenida a partir de las distintas concentraciones de BiP, desde las diferentes intensidades de bandas obtenidas en pixeles por el programa Image J.

La **Tabla 5**, muestra que BiP se pierde en el proceso de extracción ya que en la fracción microsomal se obtienen 4,7 nMoles y luego en la purificación se obtiene 0,6 nMoles. Sin embargo, en microsomas MS se obtiene prácticamente la misma cantidad final de BiP. Por lo tanto, se puede sugerir que la baja eficiencia en microsomas obtenidos desde el método combinado PS, puede estar dado por otros factores que no tienen que ver con la pérdida de BiP. Por lo cual para los ensayos de translocación *in multiplo* se utilizarán los microsomas MS por su mayor eficiencia.

Tabla 5.- Concentración de BiP durante el proceso de extracción de microsomas y comparación de BiP final en MS y método combinado PS

	[μ Molar]	Volumen Final (mL)	Final nMoles
Post-Ruptura	0,2	18,3	4,7
Fracción Microsomal	1,9	2,4	4,7
Microsomas PS	6,3	0,1	0,6
Microsomas MS	6,2	0,1	0,6

5.3.- Objetivo específico 3: Determinar mediante ensayos de translocación el rango de fuerza generado por BiP durante el proceso de translocación post-traduccional de las diferentes proteínas quimeras.

5.3.1.- Ensayos de translocación *in vitro*.

Los ensayos de translocación fueron realizados como en protocolo del laboratorio del Dr. Schekman (Lyman & Schekman, 1997) con la diferencia que el método de revelado no fue radioactivo, si no por Western Blot. Se hizo un control positivo para observar mediante Western Blot la funcionalidad de los microsomas usando Pp α f como sustrato. Este método de revelado fue estandarizado en nuestro laboratorio, debido a que la radioactividad requiere de muchos cuidados en su manipulación, además de ser muy costosa.

El Western Blot fue realizado con 3 μ M de la proteína purificada de Pp α F, la cual es usada preferentemente en los ensayos de translocación con Pp α F radioactiva. En este caso se realizó utilizando un anticuerpo específico contra Pp α F y contra Histidina. El anticuerpo de Histidina fue usado por si los sitios de glicosilación escondieran el sitio de unión contra el anticuerpo de Pp α F. Sin embargo, los resultados muestran que con el anticuerpo contra Histidina, no fue posible observar translocación, dado a que las glicosilaciones en Pp α F no fueron observadas cuando es incubado con microsomas en el **carril 7** de la **Figura 21**, ya que solo se observa la banda correspondiente a los 19 kDa y no el aumento de tamaño de la proteína (generalmente se observan tres bandas hacia arriba cuando Pp α F es glicosilada). Por otra parte tampoco disminuyó la banda de Pp α F cuando fue usada la tripsina en el **carril 8** (ensayo de protección) y cuando fue usada la tripsina más Tritón X-100 en **carril 9** de la **Figura 21**. El no observar una disminución o el corte completo de la banda de Pp α F, sugiere que al ser un péptido pequeño y desplegado, podría estar agregando, lo cual dificulta el corte con tripsina. Por otra parte las bandas que se observan superior a los 19 kDa, corresponden a las proteínas del canal Sec61 que se poseen un *Tag* de Histidina que estaría reconociendo el anticuerpo contra Histidina, en este caso Sec63 que tiene un peso molecular de 75,3 kDa es observada en los **carriles 4, 5, 7 y 8**; en los **carriles 6 y 9** la banda es degradada por tripsina y Tritón X-100. La banda entre 35 y 25 kDa podría corresponder a algún corte proteolítico de la proteína durante la purificación.

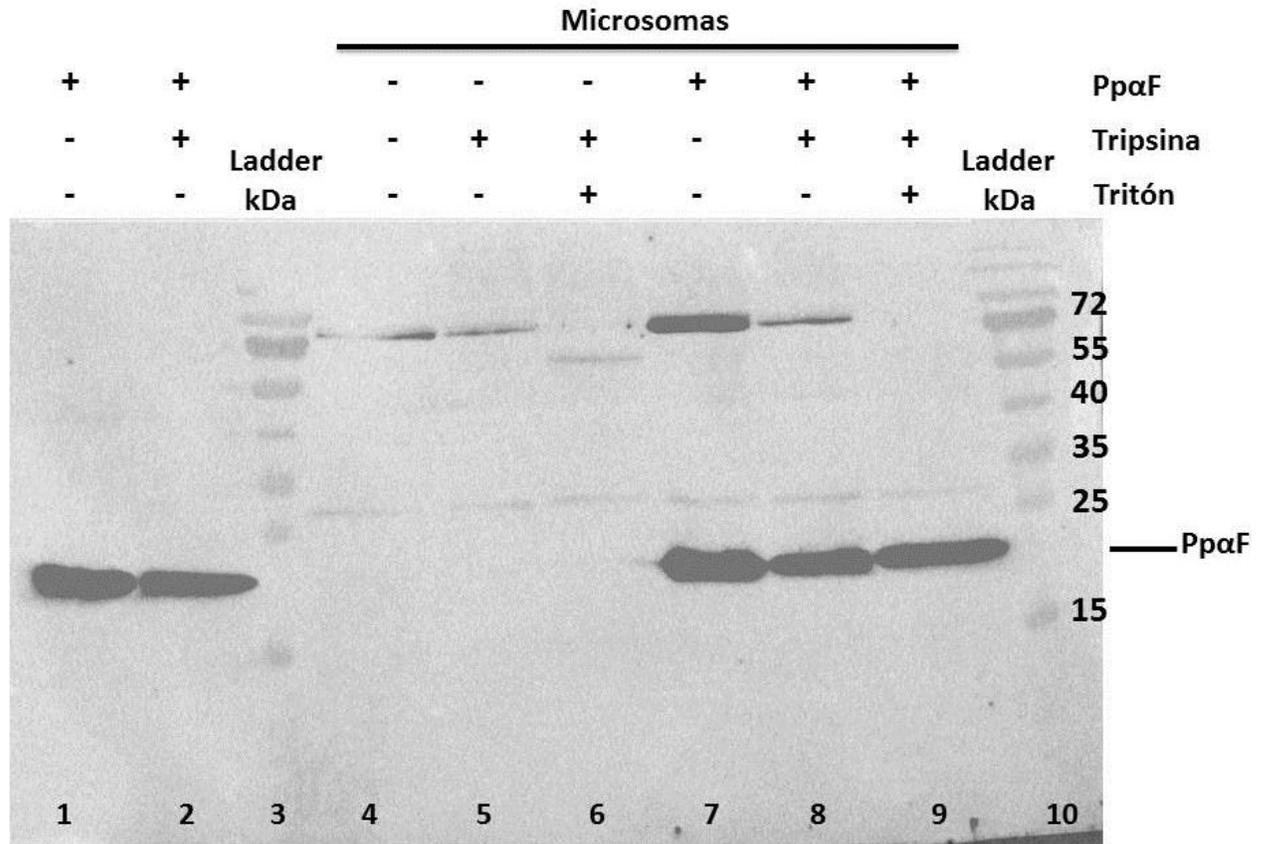


Figure 21.– Translocación de PpαF usando anti-His. Se muestra el ensayo de translocación de la proteína PpαF con microsomas, revelado por Western Blot usando 3 μM aprox. de la proteína PpαF y con un anti-His (1:1000). En el **carril 1**: cantidad total de la proteína PpαF; **carril 2**: PpαF cortada con Tripsina; **carril 3**: Estándar (Ladder) de proteína; **carril 4 al 6** corresponde al ensayo con microsomas pero sin proteína, **carril 4**: microsomas sin PpαF, **carril 5**: ensayo protección con Tripsina sin PpαF, **carril 6**: microsomas con Tripsina más Tritón X-100 sin PpαF. Luego los siguientes carriles corresponden al ensayo de translocación con microsomas y la proteína PpαF, **carril 7**: microsomas con PpαF, **carril 8**: ensayo protección con Tripsina y PpαF; **carril 9**: por último microsomas con Tripsina más Tritón X-100 y PpαF. **carril 10**: Ladder (estándar). El revelado fue realizado con ECL.

Por otro lado se usó el anticuerpo contra PpαF que se muestra en la **Figura 22**, en el cual se realizó un control negativo, con el objetivo de determinar si el anticuerpo reconocía alguna banda que pudiera arrojar un falso positivo en el lugar donde se visualizan las glicosilaciones de la proteína. Los microsomas fueron incubados sin la proteína PpαF por 1 hora (**carril 4**), luego el ensayo de protección con tripsina (**carril 5**) y el control con tripsina más Tritón X-100 (**carril 6**). Observándose así, una banda alrededor de los 35 a 25 kDa en el **carril 4**, debido a la inespecificidad del anticuerpo. Luego en los **carriles 5 y 6** de la **Figura 22** no se observa ninguna otra banda entre los 19 kDa a los 25 kDa aprox. que es donde debieran visualizarse las bandas de PpαF y glicosilación. No obstante, luego al incubar los microsomas con la proteína PpαF por 1 hora, se logra

observar en el **carril 7** dos bandas correspondientes a la glicosilación de la proteína PpαF (bandas sobre los 19 kDa), que luego del corte con tripsina se observa en el **carril 8** las bandas correspondientes a las glicosilaciones en menor intensidad, además de la banda de los 19 kDa. La baja intensidad observada en el **carril 8** se debe a que la cantidad de Tripsina fue estandarizada en una medida en que no corte todas las proteínas del microsoma, sin embargo Tripsina logra difundir hacia dentro del microsoma cortando un poco la proteína que se encuentra protegida; por último se observa la desaparición de las bandas correspondiente a las glicosilaciones con tripsina y Tritón X-100. Sin embargo no desaparece del todo la banda de 19 kDa, debido a la agregación de la proteína. Cabe mencionar que las bandas que se observan sobre los 35 kDa aproximadamente corresponden a la inespecificidad del anticuerpo contra PpαF, lo cual fue comunicado por personal del laboratorio del Dr. Randy Schekman quien nos facilitó el anticuerpo.

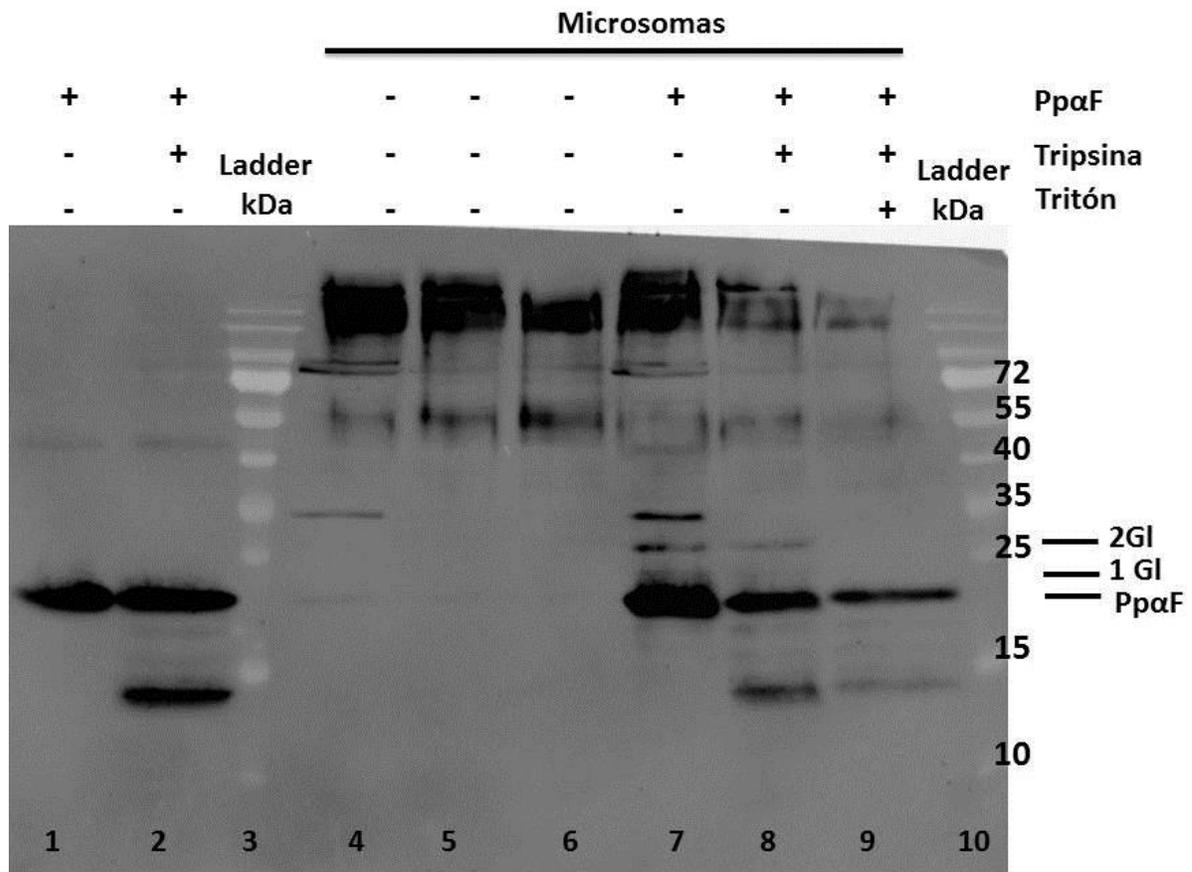


Figure 22. – Translocación de PpαF usando anti-PpαF. Se muestra el ensayo de translocación de la proteína PpαF con microsomas, revelado por Western Blot usando 3 μM aprox. de la proteína purificada de PpαF y con un anti- PpαF (1:1000). En el **carril 1**: cantidad total de la proteína PpαF; **carril 2**: PpαF cortada con Tripsina; **carril 3**: Estándar (Ladder) de proteína; **carril 4 al 6** corresponde al ensayo con microsomas pero sin la proteína PpαF, **carril 4**: microsomas sin PpαF, **carril 5**: ensayo protección con Tripsina sin PpαF, **carril 6**: microsomas con Tripsina más Tritón X-100 sin PpαF. Luego los siguientes carriles corresponden al ensayo de translocación con microsomas y la proteína PpαF, **carril 7**: microsomas con PpαF, **carril 8**: ensayo protección

con Tripsina y PpαF; **carril 9**: por último microsomas con Tripsina más Tritón X-100 y PpαF. **Carril 10**: Ladder (estándar). El revelado fue realizado con ECL.

Con estos resultados, se logró demostrar que los microsomas obtenidos por el método de Schekman son funcionales, con una eficiencia de un 22% de translocación, lo cual se encuentra dentro del porcentaje obtenido en la literatura (Chirico y cols., 1988). Además se logró estandarizar la visualización de translocación mediante Western Blot, dejando de usar radioactividad que comúnmente es usado en los ensayos de translocación *in vitro* (Brodsky y cols., 1993).

Luego de probar la funcionalidad del ensayo, esto quiere decir que los microsomas son funcionales, fue realizado otro control positivo, esta vez usando la proteína quimérica Titina. Esta construcción contiene el clonamiento de Titina en la zona específica de clonamiento para las diferentes proteínas a usar, es decir posee 2 Titinas desplegadas. De esta forma se obtuvo una construcción de la proteína quimérica Titina que contiene un largo de 227 aa la cual fue usada en los siguientes ensayos de translocación. En este resultado se usó un anticuerpo específico contra el *tag* de Histidina que contiene la proteína. El ensayo de translocación en la **Figura 23** se observa, que al ser una proteína desplegada tiende agregar en el tiempo ya que tienen expuestos sus sitios hidrofóbicos, al igual que con la proteína PpαF (**Figura 22**). Para evaluar la agregación fue realizada una cinética de agregación con diferentes tiempos para observar el porcentaje de proteína no cortada con tripsina en ausencia de microsomas. Los resultados muestran que a tiempo 0, Tripsina corta todo, **carriles 3 y 5** al igual que cuando es usada la Tripsina más Triton X-100 como se observa en el **carril 6**. Luego de 1 y 2 horas claramente se observa la agregación de la proteína en los **carriles 11 y 14**, al igual que cuando es usada la tripsina más Tritón X-100 en los **carriles 12 y 15**, porque se observa la presencia de bandas. En el **carril 9** se observa una banda cuando es usada la Tripsina más tritón a diferencia del **carril 8** en donde no se observa banda. En primera instancia, esto fue siempre observado en los primeros ensayos obtenidos de translocación lo que conllevó a realizar esta cinética de agregación, que sugiere que Tritón X-100 también promueve la agregación de la proteína que contiene 2 titinas en el tiempo.

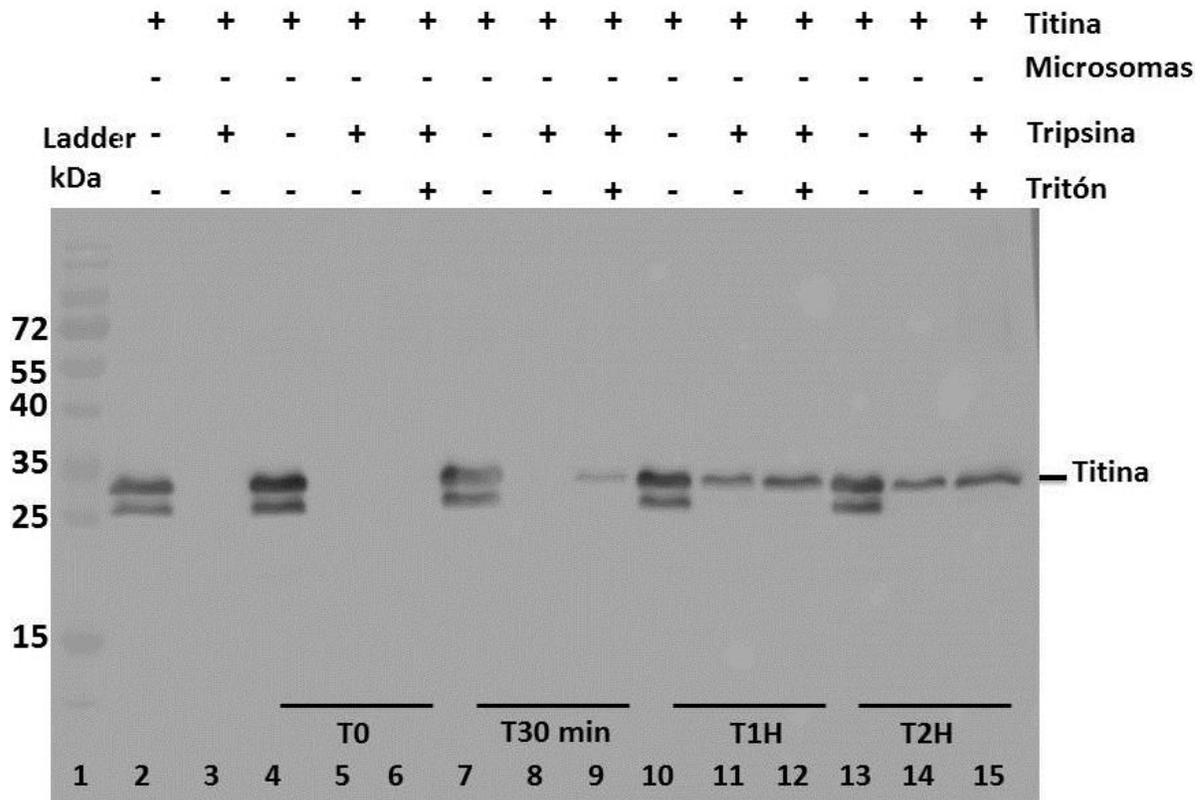


Figure 23. – Agregación de la proteína quimérica Titina en el tiempo usando un anti-His. Se muestra el ensayo de agregación de la proteína, revelado por Western Blot usando 3,7 μ M aprox. de la proteína quimera Titina y con un anti-His (1:1000). En el **carril 1**: estándar de proteína; **carril 2**: cantidad total de la proteína quimérica de Titina a tiempo 0; **carril 3**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina a tiempo 0; **carril 4**: cantidad total de la proteína quimérica de Titina a tiempo 0; **carril 5**: la proteína quimérica de Titina con Tripsina a tiempo 0, **carril 6**: la proteína quimérica de Titina con Tripsina más Tritón X-100 a tiempo 0. **carril 7**: cantidad total de la proteína quimérica de Titina después de la incubación por 30 minutos; **carril 8**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina después de la incubación por 30 minutos; **carril 9**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 30 minutos, **carril 10**: cantidad total de la proteína quimérica de Titina incubada después de la incubación por 1 hora; **carril 11**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina después de la incubación por 1 hora ; **carril 12**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 1 hora; **carril 13**: cantidad total de la proteína quimérica de Titina después de la incubación por 2 horas; **carril 14**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina después de la incubación por 2 horas; **carril 15**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina más Tritón después de la incubación por 2 horas. El revelado fue realizado con West Femto.

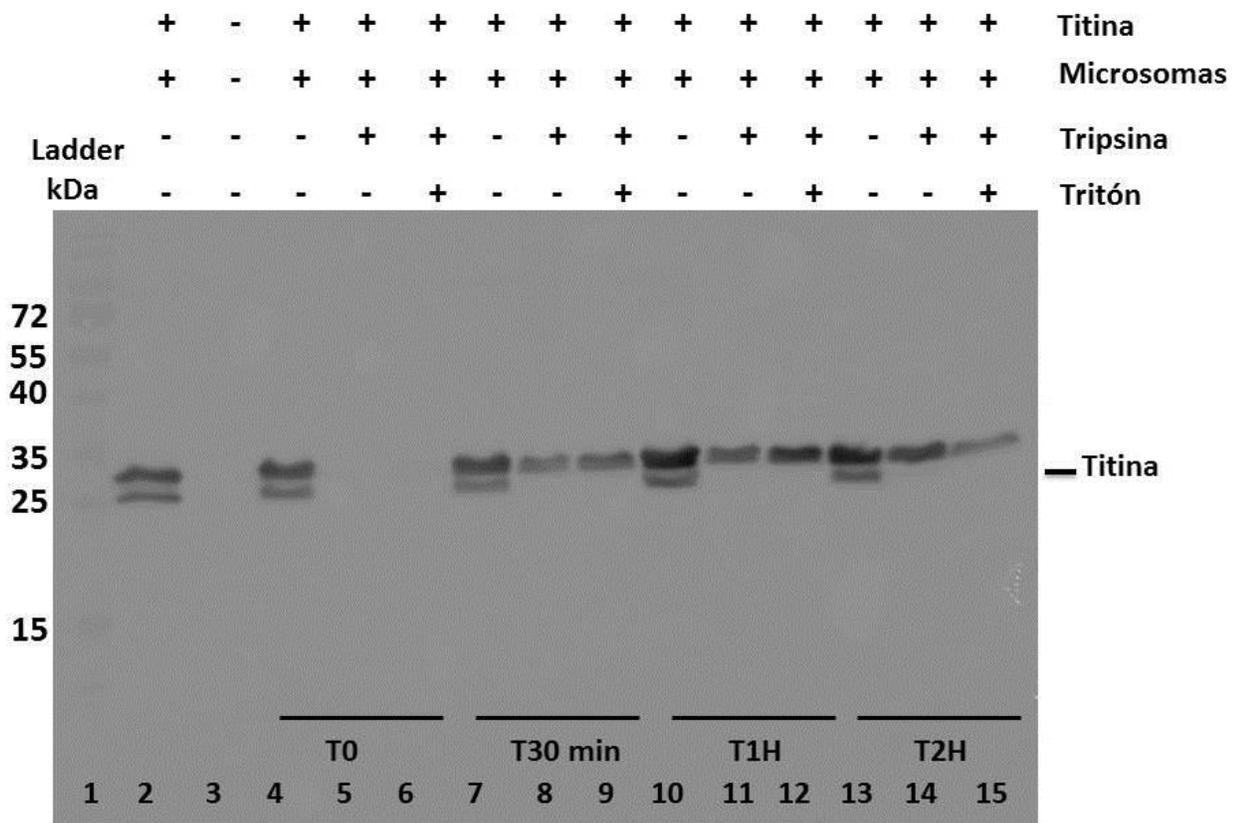


Figure 24. – Translocación con la proteína quimérica Titina usando anti-His. Se muestra el ensayo de translocación de la proteína quimérica de Titina con microsomas, revelado por Western Blot usando 3,7 μ M aprox. de la proteína quimera Titina y con un anti-His (1:1000). En el **carril 1**: estándar de proteína; **carril 2**: cantidad total de la proteína quimérica de Titina a tiempo 0 con microsomas; **carril 3**: sin muestra; **carril 4**: cantidad total de la proteína quimérica de Titina a tiempo 0 con microsomas; **carril 5**: la proteína quimérica de Titina con Tripsina a tiempo 0 con microsomas, **carril 6**: la proteína quimérica de Titina con Tripsina más Tritón X-100 a tiempo 0 con microsomas. **Carril 7**: cantidad total de la proteína quimérica de Titina después de la incubación por 30 minutos con microsomas; **carril 8**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina después de la incubación por 30 minutos con microsomas; **carril 9**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina más Tritón X-100 a los 30 minutos con microsomas, **carril 10**: cantidad total de la proteína quimérica de Titina después de la incubación por 1 hora con microsomas; **carril 11**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina después de la incubación por 1 hora con microsomas; **carril 12**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 1 hora con microsomas; **carril 13**: cantidad total de la proteína quimérica de Titina después de la incubación por 2 horas con microsomas; **carril 14**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina después de la incubación por 2 horas con microsomas; **carril 15**: la proteína quimérica de Titina cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 2 horas. El revelado fue realizado con West Femto.

Sin embargo, la obtención del porcentaje de translocación fue realizada en base a la cuantificación de las diferentes intensidades de bandas mediante el programa ImageJ en cada una de las condiciones de la cinética de agregación y translocación. Estas intensidades fueron restadas para obtener solamente lo correspondiente a translocación y no a agregación. En detalle, el análisis fue realizado en la condición de 2 horas de incubación de la proteína a los 20°C de la **Figura 23**. En el caso del gel de agregación, la intensidad de banda que corresponde a la cantidad total de proteína usada (equivalente al 100%) en el **carril 13** resultó ser 42115,66 pixeles, en el **carril 14** proteína con Tripsina: 15054,054 pixeles, por último proteína con Tripsina más Tritón X-100: 23456,681 pixeles. Luego el porcentaje de la proteína no cortada por la Tripsina fue de un 36 %.

Posteriormente en la condición de 2 horas de incubación de la proteína a los 20°C con microsomas (gel de translocación) de la **Figura 24** la intensidad de banda obtenida en pixeles del ensayo de translocación en el **carril 13** correspondiente a la cantidad total de proteína usada (equivalente al 100%) fue de 48817,61 pixeles, en el **carril 14** proteína con Tripsina: 27645,731 pixeles, por último proteína con Tripsina más Tritón X-100: 13676,803 pixeles en el **carril 15**. Por lo tanto el porcentaje de proteína no cortada por la Tripsina en translocación fue de un 57 %.

Estos resultados muestran que el porcentaje de la proteína quimérica de Titina obtenido a las 2 horas de la proteína no cortada en el ensayo de translocación (57 %) al ser restado al porcentaje obtenido en la cinética de agregación (36 %) se obtiene un porcentaje total de translocación neto correspondiente al 21 %.

Por lo tanto, estos resultados muestran que la construcción de la proteína quimérica de Titina es una proteína que se mantiene desplegada, y que mediante la secuencia señal de reconocimiento por el canal Sec61 en los ensayos de translocación con microsomas de levadura, resultó ser competente para translocación obteniéndose así, un 21% total de translocación considerando el porcentaje no cortado por efecto de la agregación de la proteína en el tiempo. Además el porcentaje de translocación obtenido resulta ser similar a lo obtenido en el ensayo de translocación con PpαF en este estudio y a lo que se encuentra reportado en la literatura (Chirico y cols., 1988).

Luego de probar los controles positivos, se usó la quimera de Top7, como control negativo, usando el anticuerpo específico contra el *tag* de Histidina. El ensayo de translocación fue realizado a diferentes tiempos, y no se observa una protección de la banda cuando fue usada la Tripsina en los **carriles 9 y 12** de la **Figura 25** ya que se degrada por completo. Por otro lado a diferencia de los ensayos anteriores con PpαF y la proteína quimérica de Titina, cuando fue realizado el ensayo de protección con Tripsina y Tripsina más Tritón X-100 con Top7, la proteína es cortada con un 100% de eficiencia y no se observa agregación en el tiempo. Esto sugiere

que la construcción de la proteína quimérica de Top7 adopta la estructura proteica esperada que contiene una parte desplegada y otra plegada. De esta forma no expone sus sitios hidrofóbicos por lo que no agrega en el tiempo. Por lo tanto este resultado sugiere que BiP no es un motor molecular que ejerza una alta fuerza, ya que Top7 posee una fuerza de desplegamiento aproximado de 30 pN a 45 pN. Esta fuerza es más alta que la fuerza que puede llegar a generar un motor molecular de tipo *power stroke* descrito en la literatura (Bustamante y cols., 2004)..

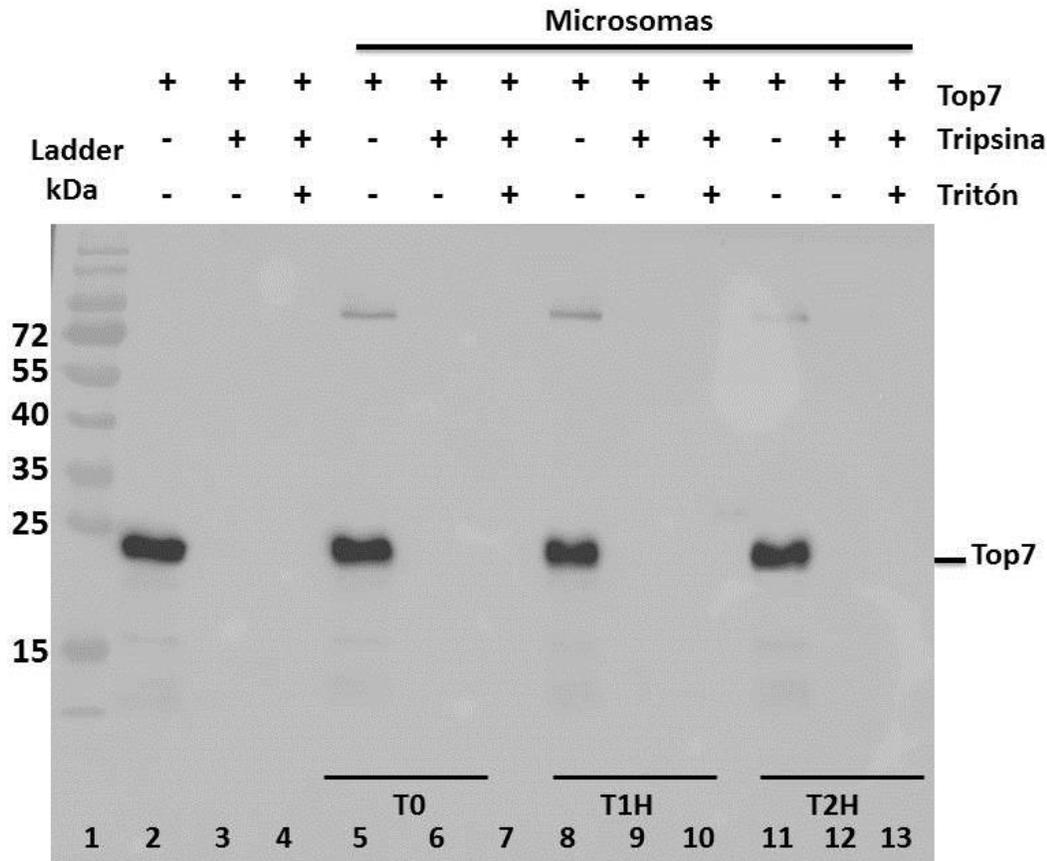


Figura 25. – Translocación con la proteína quimérica Top7 usando anti-His. Se muestra el ensayo de translocación de la proteína quimérica de Top7 con microsomas, revelado por Western Blot usando 3,7 μ M aprox. de la proteína quimera Top7 y con un anti-His (1:1000). En el **carril 1**: estándar de proteína; **carril 2**: cantidad total de la proteína quimérica de Top7 a tiempo 0 sin microsomas; **carril 3**: la proteína quimérica de Top7 cortada con Tripsina a tiempo 0 sin microsomas; **carril 4**: la proteína quimérica de Top7 cortada con Tripsina más Tritón X-100 a tiempo 0 sin microsomas; **carril 5**: la proteína quimérica de Top7 con Tripsina a tiempo 0 con microsomas; **carril 6**: la proteína quimérica de Top7 con Tripsina más Tritón X-100 con microsomas; **carril 7**: cantidad total de la proteína quimérica de Top7 después de la incubación por 30 minutos con microsomas; **carril 8**: la proteína quimérica de Top7 cortada con Tripsina después de la incubación por 30 minutos con microsomas; **carril 9**: la proteína quimérica de Top7 cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 30 minutos con microsomas, **carril 10**: cantidad total de la proteína quimérica de Top7 después de la incubación por 1 hora con microsomas; **carril 11**: la proteína quimérica de

Top7 cortada con Tripsina después de la incubación por 1 hora con microsomas; **carril 12:** la proteína quimérica de Top7 cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 1 hora con microsomas; **carril 13:** la proteína quimérica de Top7 después de la incubación por 2 horas con microsomas; **carril 14:** la proteína quimérica de Top7 cortada con Tripsina después de la incubación por 2 horas con microsomas; **carril 15:** la proteína quimérica de Top7 cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 2 horas con microsomas. El revelado fue realizado con West Femto.

Luego de haber probado que el sistema de translocación es funcional mediante los ensayos de translocación con la construcción de la proteína quimérica de Titina anteriormente mostrado y luego de haber probado los controles positivo y negativo, se procedió a evaluar si BiP ejerce fuerza en translocación usando la fracción enriquecida obtenida en la primera purificación de la construcción de la proteína quimera CaM realizada en presencia de calcio. Para ello se usaron 2 anticuerpos, el anticuerpo específico contra CaM y contra el *Tag* de Histidina para determinar glicosilaciones. Mediante un análisis de la secuencia de la construcción de la proteína quimérica de CaM se determinó que existen 2 sitios posibles para glicosilación en caso de que la proteína sea translocada. En la **Figura 26**, se observa en el **carril 3** que corresponde a la incubación de la proteína con el microsoma por 1 hora a 20°C, la banda de 35 kDa que corresponde a la proteína quimera CaM, además de la degradación (bajo los 35 kDa) y una banda en los 70 kDa que corresponde al *Tag* de Histidina que posee la proteína Sec63 que también fue observado en los experimentos donde fue usado este mismo anticuerpo, sin embargo, luego de realizar el corte con Tripsina (**carril 4**) y Tripsina más Tritón X-100 (**carril 5**) las bandas desaparecen, no observándose translocación en el ensayo de protección. Luego un control negativo fue realizado para determinar si el anticuerpo contra el *Tag* de Histidina reconoce alguna banda sobre los 35 kDa. Para ello fue realizado el ensayo de translocación por 1 hora a 20 °C con las distintas condiciones pero sin la proteína observándose solo la banda de 70 kDa que luego desaparece con Tripsina y con Tripsina más Tritón (**carriles 8, 9 y 10**). De la misma manera fue ensayado el anticuerpo específico contra CaM, en la **Figura 27**.

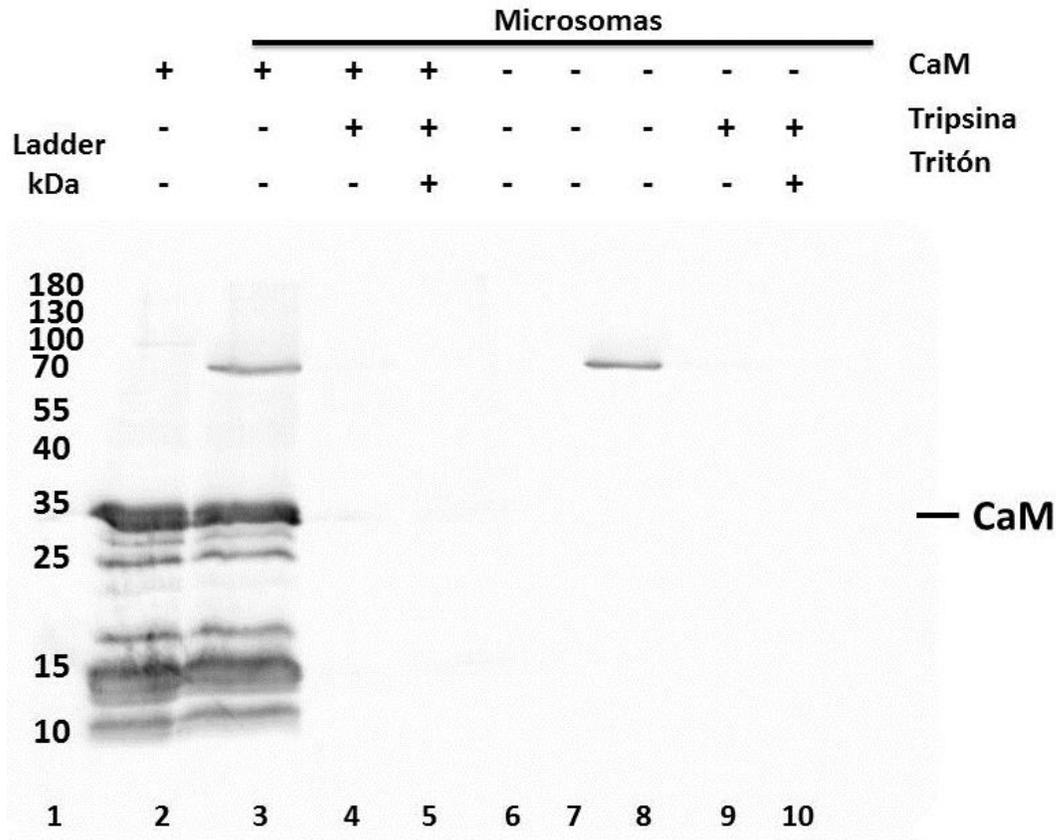


Figura 26. – Prueba del anticuerpo contra el *Tag* de Histidina en el ensayo de translocación con la proteína quimera CaM en presencia de calcio. Se muestra el ensayo de translocación con microsomas de la proteína quimera CaM, revelado por Western Blot usando 3 μ M aprox. de la proteína purificada de la quimera CaM y con un anti-CaM (1:3000). En el **carril 1**: Estándar de proteína; **carril 2**: cantidad total de la proteína quimera CaM; **carril 3**: la proteína quimera CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 1 hora; **carril 3 al 5** corresponde al ensayo con microsomas mas la proteína quimera CaM. En el **carril 4**: proteína quimera CaM después de la incubación por 1 hora con microsomas, **carril 5**: la proteína quimera CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 1 hora con microsomas, **carril 6**: la proteína quimera CaM cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 1 hora con microsomas; **carril 6**: sin muestra, **carril 7**: sin muestra; **carril 8 al 10** corresponde al ensayo de translocación sin la proteína quimera CaM. En el **carril 8**: microsomas sin la proteína quimera CaM después de la incubación por 1 hora; **carril 9**: microsomas sin la proteína quimera CaM con Tripsina después de la incubación por 1 hora; **carril 10**: microsomas sin la proteína quimera CaM con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 1 hora. El revelado fue realizado con ECL.

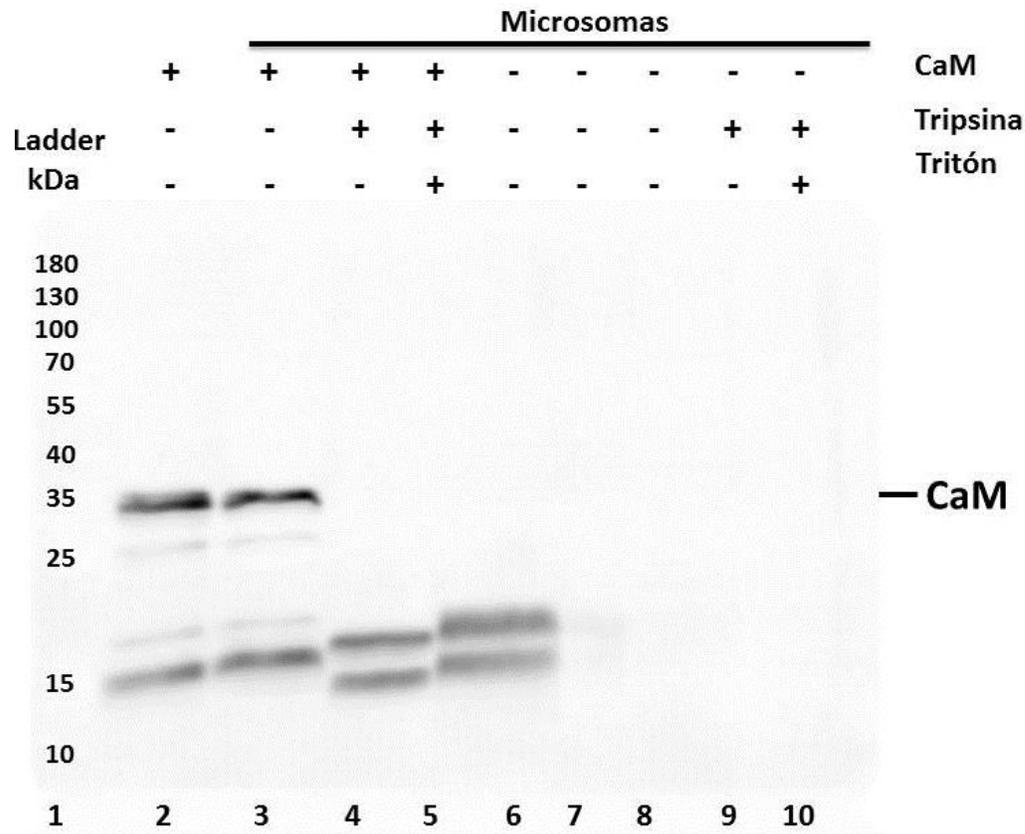


Figura 27.– Prueba del anticuerpo contra CaM en el ensayo de translocación con la proteína quimera CaM en presencia de calcio. Se muestra el ensayo de translocación con microsomas de la proteína quimérica CaM, revelado por Western Blot usando 3 μ M aprox. de la proteína purificada de la quimera CaM y con un anti-CaM (1:3000). En el **carril 1**: estándar de proteína; **carril 2**: cantidad total de la proteína quimérica CaM; carril 3 al 5: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 1 hora; **carril 4 al 6** corresponde al ensayo con microsomas mas la proteína quimérica CaM. En el **carril 4**: la proteína quimérica CaM después de la incubación por 1 hora con microsomas, **carril 5**: ensayo protección con Tripsina, **carril 6**: ensayo con Tripsina más Tritón X-100. **carril 7** no contiene muestra, **carril 8 al 10** corresponde al ensayo de translocación sin proteína. . En el **carril 8**: microsomas sin la proteína quimera CaM luego de 1 hora de incubación, **carril 5**: ensayo protección con Tripsina, **carril 6**: ensayo con Tripsina más Tritón X-100 El revelado fue realizado con ECL.

Al comparar los resultados de la **Figura 26** y **27** se observó un resultado más limpio usando el anticuerpo contra CaM al obtener el reconocimiento solo de las bandas esperadas correspondientes a los 35 kDa además de la degradación, por lo que será usado en los siguientes ensayos de translocación. Por otro lado en este resultado no se observa translocación con ninguno de los 2 anticuerpos usados, lo cual podría deberse a una interacción con la secuencia señal a altas concentraciones de calcio (Shao & Hegde, 2011), lo que podría estar inhibiendo la translocación. Para mejorar esto, la segunda purificación fue realizada sin calcio y los tiempos de incubación fueron aumentados como se observa en la **Figura 28**, sin embargo aun así, no fue

posible observar translocación ya que la banda es cortada completamente en el ensayo de protección con Tripsina y cuando fue usada la Tripsina más Tritón (**carriles 8, 9, 11 y 12**), además se observa degradación de la proteína a las 3 horas de incubación.

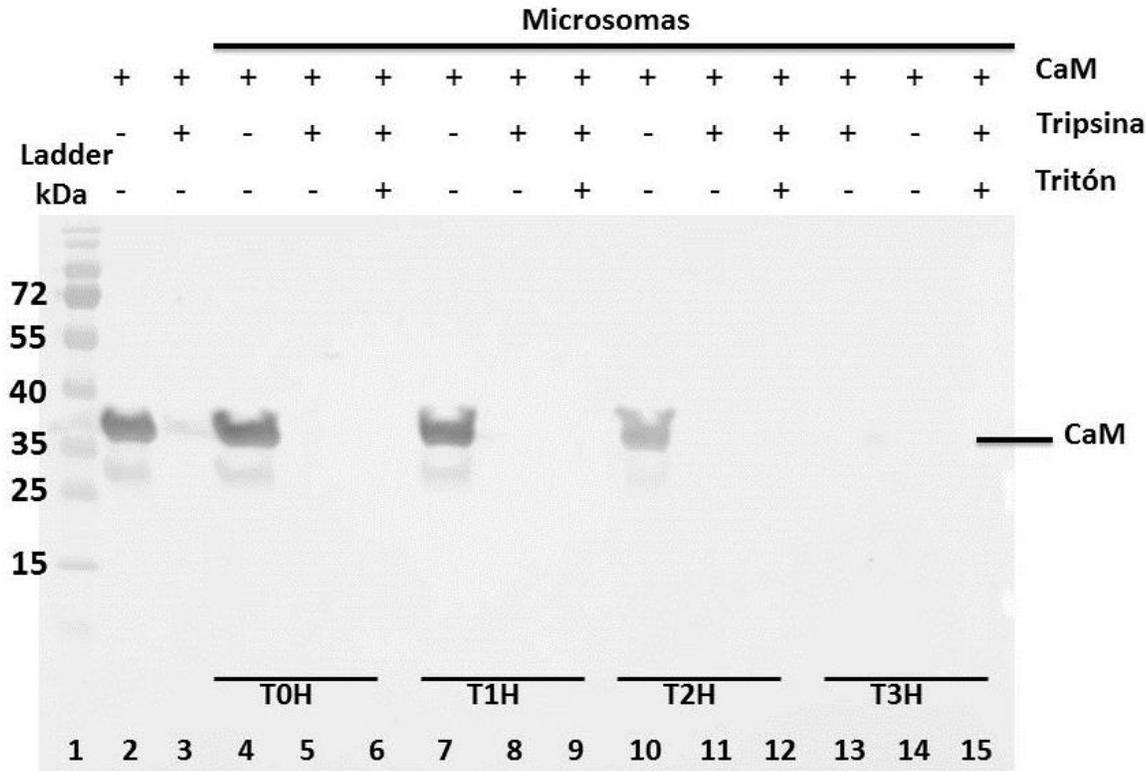


Figura 28.– Translocación con la proteína quimérica CaM usando anti-CaM. Se muestra el ensayo de translocación de la proteína quimérica CaM con microsomas, revelado por Western Blot usando 3 μ M aprox. de la proteína quimera CaM y con un anti-CaM (1:3000). En el **carril 1**: estándar de proteína; **carril 2**: cantidad total de la proteína quimérica CaM; **carril 3**: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 1 hora sin microsomas; **carril 4 al 15** corresponde al ensayo con microsomas más la proteína quimérica CaM; **carril 4**: la proteína quimérica de CaM incubada con microsomas a tiempo 0; **carril 5**: la proteína quimérica de CaM con Tripsina a tiempo 0, **carril 6**: la proteína quimérica de CaM con Tripsina más Tritón X-100 a tiempo 0. **carril 7**: la proteína quimérica CaM después de la incubación por 1 hora con microsomas; **carril 8**: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 1 hora con microsomas; **carril 9**: la proteína quimérica de CaM cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 1 hora con microsomas, **carril 10**: la proteína quimérica CaM después de la incubación por 2 horas con microsomas; **carril 11**: la proteína quimérica de CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 2 horas con microsomas; **carril 12**: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 2 horas con microsomas; **carril 13**: la proteína quimérica CaM después de la incubación por 3 horas con microsomas; **carril 14**: la proteína quimérica de CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 3 horas con microsomas; **carril 15**: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 3 horas con microsomas. El revelado fue realizado con West Femto.

Por otra parte, cabe mencionar que los microsomas contienen alrededor de 10 μM de calcio por lo que 0,5 mM de EDTA fue usado para quelar el calcio remanente del ensayo (Strayle y cols., 1999) como se muestra en la **Figura 29**, en donde tampoco se observa translocación en los carriles **8, 9, 11 y 12**. Estos resultados sugieren que BiP podría ser un tipo de motor molecular *ratchet*. Para descartar y lograr desplegar un poco la proteína de Calmodulina fue realizado un ensayo de translocación con 1 M Urea lo cual despliega un poco la proteína, sin embargo no se observó translocación (**Figura 30**).

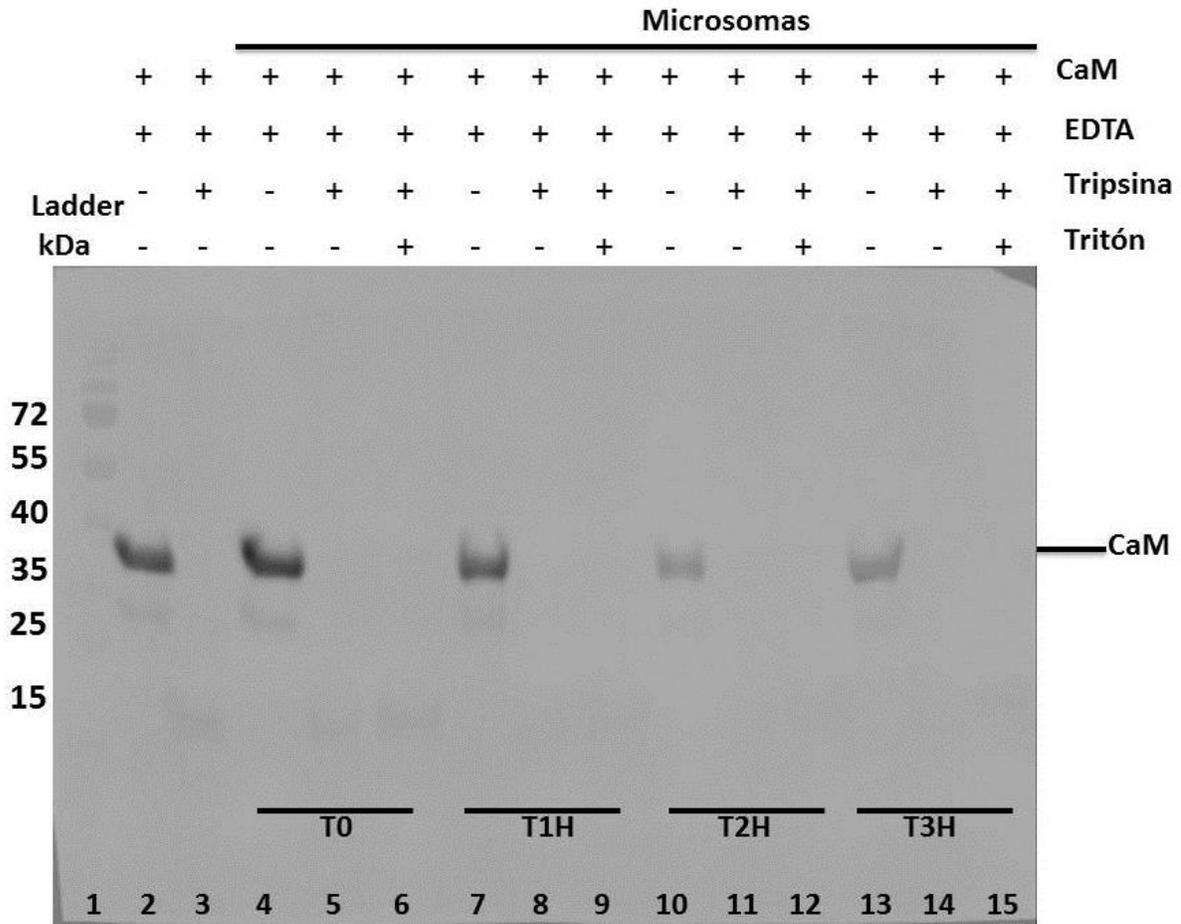


Figura 29. – Translocación con la proteína quimérica CaM y 5mM de EDTA usando anti-CaM. Se muestra el ensayo de translocación de la proteína quimérica de CaM con microsomas y 5 mM de EDTA en las diferentes condiciones, revelado por Western Blot usando 3 μM aprox. de la proteína quimera CaM y con un anti-CaM (1:3000). En el **carril 1**: estándar de proteína; **carril 2**: cantidad total de la proteína quimérica de CaM; **carril 3**: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 1 hora sin microsomas; **carril 4 al 15** corresponde al ensayo con microsomas más la proteína quimérica CaM; **carril 4**: la proteína quimérica CaM incubada con microsomas a tiempo 0 con microsomas; **carril 5**: la proteína quimérica de CaM con Tripsina a tiempo 0 con microsomas; **carril 6**: la proteína quimérica de CaM con Tripsina más Tritón X-100 a tiempo 0. **carril 7**: la proteína quimérica CaM después de la incubación por 1 hora con microsomas; **carril 8**: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 1 hora con microsomas; **carril 9**: la proteína quimérica de CaM cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 1 hora con

microsomias, **carril 10**: la proteína quimérica CaM después de la incubación por 2 horas con microsomias; **carril 11**: la proteína quimérica de CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 2 horas con microsomias; **carril 12**: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 2 horas con microsomias; **carril 13**: la proteína quimérica CaM después de la incubación por 3 horas con microsomias; **carril 14**: la proteína quimérica de CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 3 horas con microsomias; **carril 15**: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 3 horas con microsomias. Revelado fue realizado con West Femto.

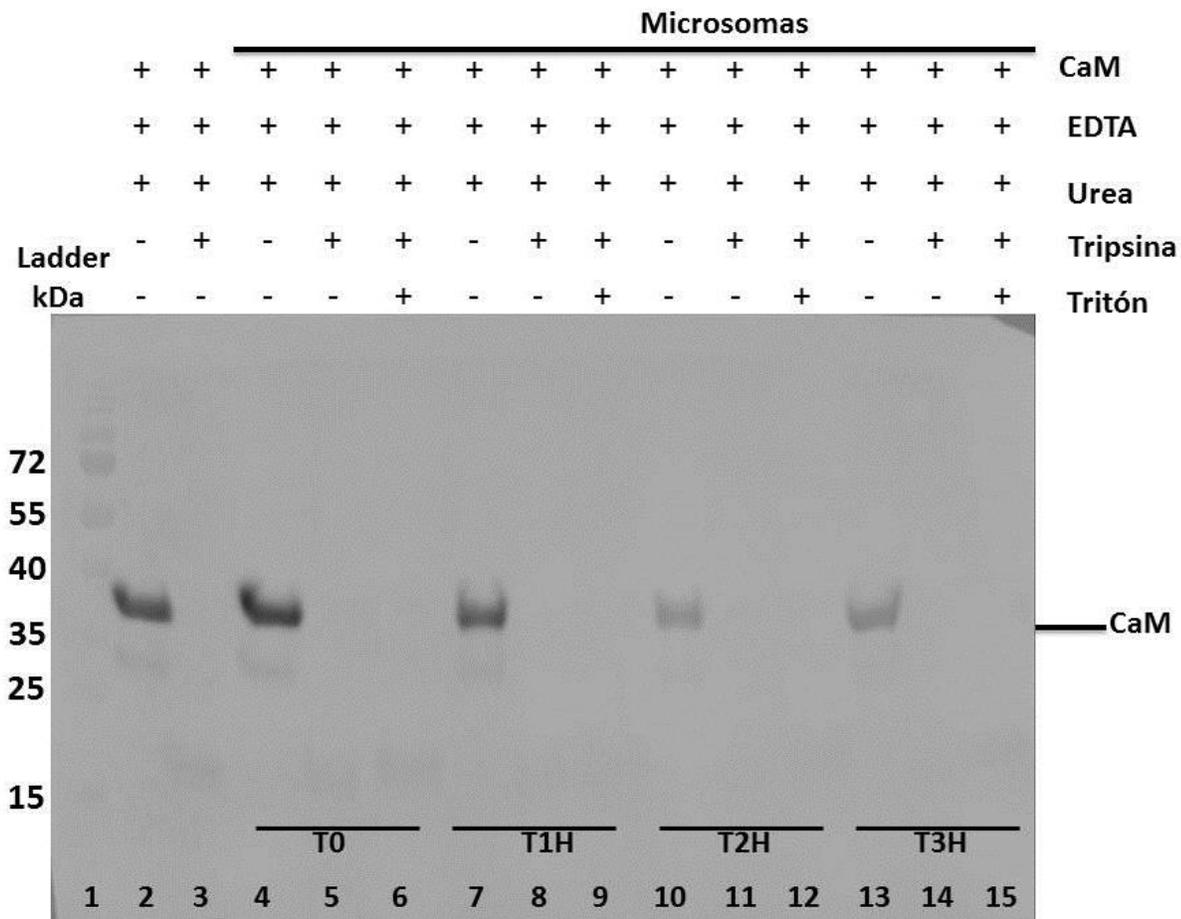


Figure 30. – Translocación con la proteína quimérica CaM con 5 mM de EDTA y 1M Urea usando anti-CaM. Se muestra el ensayo de translocación de la proteína quimérica CaM con microsomias, más 1 M Urea y 5 mM EDTA en todas las condiciones. En el **carril 6**: la proteína quimérica de CaM con Tripsina más Tritón X-100 a tiempo 0. **carril 7**: la proteína quimérica CaM después de la incubación por 1 hora con microsomias; **carril 8**: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 1 hora con microsomias; **carril 9**: la proteína quimérica de CaM cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 1 hora con microsomias, **carril 10**: la proteína quimérica CaM después de la incubación por 2 horas con microsomias; **carril 11**: la proteína quimérica de CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 2 horas con microsomias; **carril 12**: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 2 horas con microsomias; **carril 13**: la proteína quimérica CaM después de la incubación por 3 horas con microsomias; **carril 14**: la proteína quimérica de CaM cortada con Tripsina después de la incubación por 3

horas con microsomas; **carril 15**: la proteína quimérica CaM cortada con Tripsina más Tritón X-100 después de la incubación por 3 horas con microsomas. Revelado fue realizado con West Femto.

6.- DISCUSIÓN

Un motor molecular de tipo *ratchet*, es aquel que es impulsado directamente por las fluctuaciones del Baño térmico y rectificado por reacciones químicas. A diferencia de un motor de tipo *power stroke* que es impulsado directamente por el movimiento de la proteína (Wagoner & Dill, 2016; Wang & Oster, 2002). Una forma de determinar si un motor molecular es *ratchet* o *power stroke*, es obteniendo el trabajo realizado por dicho motor y el trabajo puede ser obtenido mediante la fuerza por distancia. En el caso de BiP la distancia es de 1 nm (Marcinowski y cols., 2011); sin embargo, es importante mencionar que el valor de 1 nm es el que se observa por estudios de fluorescencia de BiP en solución, pero no específicamente en la translocación. Estudios del grupo del Dr. Toshiya Endo (Sangyo University en Japón) han mostrado que el tamaño del paso de motor pudiese ser mayor a 1 nm, ya que postula que el mínimo paso del motor debiese ser el tamaño del sitio de unión de BiP a la proteína que atraviesa el canal, lo cual es mayor a 7 aminoácidos, es decir sobre 2,4 nm (Yamano y cols., 2008).

Por ejemplo la miosina II, posee una fuerza aproximada de 5 pN y la distancia de su movimiento es de 5,3 nm, entonces como se ha definido que el trabajo es igual a la fuerza por distancia, en este caso tenemos entonces que miosina II realiza un trabajo de 26,5 pNm y como 1 $K_B T$ (valor del baño térmico) es igual a 4,1 pNm, entonces finalmente obtenemos que Miosina II posee 108,65 $K_B T$. Siendo este valor mayor al del baño térmico de 3 $K_B T$, lo cual al ser mayor se define como un motor molecular de *Power stroke*.

Para determinar si BiP ejerce un trabajo mayor a la del baño térmico, en translocación post-traduccional, una nueva metodología *in multiplo*, fue desarrollada en esta Tesis para medir fuerzas *in multiplo* a través de diferentes construcciones quiméricas de proteínas que contienen diferentes fuerzas de desplegamiento para la translocación *in vitro*. Para ello se obtuvieron microsomas de levadura por el método de Schekman y usaron para los ensayos de translocación con las proteínas quiméricas. La funcionalidad de los microsomas fue estandarizado en esta Tesis mediante Western Blot, resultando ser funcionales mediante la visualización de las bandas correspondiente a la glicosilación de la proteína purificada de Pp α F, que solo es glicosilada cuando ingresa al microsoma (**Figura 22**). Se observan comúnmente tres glicosilaciones, una banda de 24 kDa, 27 kDa y 32 kDa (Chirico y cols., 1988), sin embargo no logramos observar la banda de 32 kDa lo cual podría deberse a que el anticuerpo no se unió al sitio de reconocimiento producto de la misma glicosilación. Por otra parte, la banda de Pp α F baja su peso molecular al ser translocada, pero esto no se logra observar por que no usamos geles de urea que ayuda a resolver mejor la migración de esta diferencia en tamaño molecular (Waters y cols., 1988) cuando fue usado el anticuerpo contra el *Tag* de Histidina y el otro anticuerpo contra la proteína Pp α F (**Figura 21 y 22**).

La construcción quimérica de Titina fue probado como control positivo. Esta proteína fue usada debido a que el sustrato de translocación post-traducciona es competente solo cuando se encuentra desplegado. Al estar desplegada no requiere de una fuerza de desplegamiento, por lo que mediante el porcentaje de eficiencia de translocación obtenido del 21% (**Figura 23 y 24**), lo que es comúnmente observado en la literatura y que demuestra que la construcción quimérica logra ser funcional. Este éxito de construcción quimérica se debe a que contiene primordialmente la secuencia señal proveniente de PpαF, la cual es una proteína comúnmente usada en estudios de translocación post-traducciona.

Uno de los motores moleculares que usan altas fuerzas, es el fago Φ29 el cual posee un valor de trabajo de 38,76 pNnm y 158,92 $K_B T$, el cual es el que ejerce el más alto trabajo reportado hasta el momento (Bustamante y *cols.*, 2004). Por lo tanto, Top7 fue usado como control negativo en este estudio porque poseería un valor de trabajo de 30 pNnm y 123 $K_B T$, sin embargo, esta es una fuerza promedio de desplegamiento registrado en pinzas ópticas, pero se ha llegado a registrar una fuerza máxima de 45 pN (Goldman y *cols.*, 2015). Por ende, el trabajo que debería ejercer BiP estaría sobre los 3,76 pNnm y por el momento no se han registrado motores moleculares que lleguen a ejercer tal trabajo, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en translocación con Top7 en **Figura 25**.

Calmodulina en pinzas ópticas exhibe un comportamiento de plegamiento y replegamiento al equilibrio a 7 pN (Goldman y *cols.* 2015), esto significa que independientemente de la velocidad de tiraje que podría estar ejerciendo un motor molecular como BiP, la fuerza de desplegamiento va a ser siempre de 7 pN en presencia de calcio. Sin embargo, no se observó translocación con la construcción de la proteína quimérica CaM en presencia de calcio (**Figura 26 y 27**). Posiblemente esto se pueda deber a la interacción de calcio que pueda tener con la secuencia señal y Calmodulina provocando una inhibición. Por otro lado, los ensayos realizados con EDTA para quelar el calcio remanente resulta ser inespecífico y podría estar quelando otros iones importantes como el magnesio el cual es importante para la función de la proteína BiP (Behnke y *cols.*, 2015).

En el caso de haber obtenido una cinética de translocación con la construcción de la proteína quimérica de CaM menos la cinética de translocación de la proteína quimérica de Titina, hubiéramos obtenido el tiempo de desplegamiento de la proteína quimérica CaM. El valor de desplegamiento de esta quimera hubiera sido extrapolado a los valores de la cinética de desplegamiento versus fuerza reportado por pinzas ópticas, obteniéndose un valor de fuerza obteniéndose así el trabajo ejercido por BiP como se observa en la **Figura 31**.

$$W = F \times d$$

W= trabajo
F= Fuerza
d= Distancia

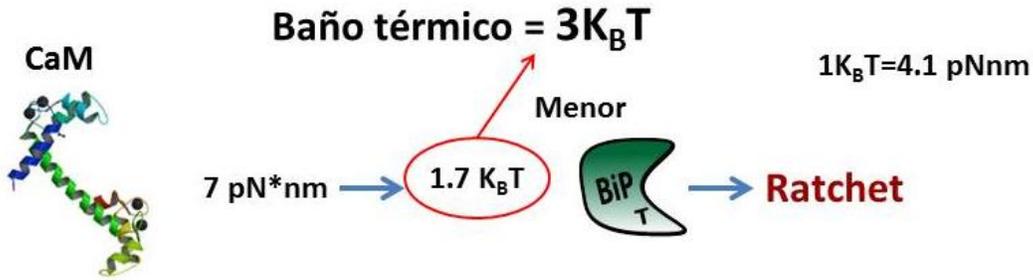
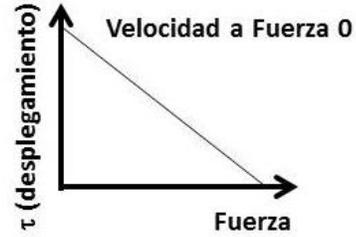


Figura 31.- Esquema general del análisis de datos. Principalmente el trabajo que pueda ejercer la proteína BiP será calculado por $W=F \times d$, donde la distancia de BiP es de 1nm (Marcinowski y cols., 2011). Posteriormente mediante los datos de tiempos de desplegamiento de cada una de las proteínas a fuerza 0, se encuentran reportados y estos podrán ser comparados al obtener la cinética de desplegamiento mediante los ensayos de translocación de cada una de las proteínas a usar. En el caso de CaM como es una proteína que se encuentra al equilibrio, independiente de la fuerza que se ejerza esta siempre se desplegará a 7 pN. Al multiplicar el valor de la fuerza de desplegamiento de CaM por la distancia el valor final puede ser obtenido en $k_B T$ el cual es de 1,7 $K_B T$ y este valor es menor al del baño térmico lo cual sugeriría que BiP es un motor molecular del tipo *Ratchet*.

Como en este caso no observamos que BiP permitiera pasar a la proteína quimérica CaM, no se logra calcular la fuerza ni tampoco el trabajo por lo que estos resultados preliminarmente nos sugieren a BiP como un motor netamente pasivo de *ratchet*. Por lo tanto la hipótesis propuesta como: “En el mecanismo de acción de la proteína BiP como motor molecular, ésta ejerce una fuerza de tiraje que permite translocar proteínas post-traduccionalmente (mecanismo denominado *power stroke*)”, es refutada por los resultados obtenidos en este estudio.

7.- CONCLUSIONES

1.- Se logró generar los plasmidios que contienen las secuencias de las proteínas quiméricas de CaM, Titina y Top7. Esto se comprobó a través de la secuenciación y alineamiento, obteniéndose un 100% de identidad en cada una de las secuencias de las proteínas quiméricas con respecto a las diseñadas. Además, se logró expresar y purificar estas quimeras.

2.- El método mejorado Parodi-Schekman desarrollado en esta tesis logra ser funcional, sin embargo, el porcentaje de translocación resultó ser 43% menor que el de Schekman, debiéndose quizás al método de ruptura celular. Los microsomas obtenidos por el método mejorado Parodi-Schekman resulta ser más agresivo, por ser una ruptura mecánica de la célula completa con esferas de vidrio. Se corroboró que la cantidad de BiP dentro del microsoma purificado desde el método mejorado Parodi-Schekman permanece igual que a la cantidad de BiP en método Schekman.

3.- Los ensayos de translocación, usando el modelo canónico de la proteína PpαF corroboraron que es posible poder visualizar translocación mediante Western Blot usando anti-PpαF.

4.- La proteína quimérica de Titina desplegada es un buen control positivo para la translocación en microsomas *in vitro*. Con este modelo se logró observar un 30% translocación a las 2 horas concluyendo que la construcción de la proteína quimérica es funcional.

5.- Por otra parte, al no observar la proteína quimérica CaM translocada nos estaría sugiriendo que BiP funcionaría como un motor molecular de tipo *ratchet*.

6.- Se logró desarrollar esta nueva metodología de medir fuerzas en microsomas *in vitro*, la cual logra ser funcional para poder estudiar fuerzas *in multiplo*, ya que generalmente los estudios de mediciones de fuerza se realizaban a nivel de moléculas individuales.

8.- PROYECCIONES

Finalmente como proyección de esta tesis, será realizar un Western Blot con un anticuerpo contra Titina para así demostrar que la parte desplegada de la quimera logra entrar mediante la interacción que tiene la secuencia señal con el canal Sec61. Otra alternativa es también añadir un sitio de glicosilación a la parte desplegada (Titina) lo cual permitiría observar de translocación porque solo es glicosilada dentro del microsoma y un control negativo usando una glicosilasa que corte la glicosilación. Esto sería una manera alternativa de demostrar que BiP es un motor de tipo *ratchet*. Consolidando este nuevo modelo experimental como uno que permitiría medir fuerzas *in multiplo*. De esta manera se podría sustentar mejor que BiP es un tipo de motor molecular pasivo *ratchet*.

En resumen, a través de esta tesis se ha podido diseñar un nuevo tipo de ensayo para medir fuerzas *in multiplo*. En este caso, BiP preliminarmente pareciera que fuese un motor del tipo *ratchet*, es decir, no ejerce fuerza de manera activa para permitir el ingreso de los sustratos. Podríamos hacer el mismo ensayo, usando en vez de BiP otras chaperonas como las Hsp93 de cloroplastos que si ejercen una fuerza. En ese caso, al conocer la fuerza que ejerce Hsp93 y usar sustratos plegados que no conocemos su fuerza, si la proteína transloca, sabríamos que se despliega a una fuerza menor que la que ejerce esta chaperona.

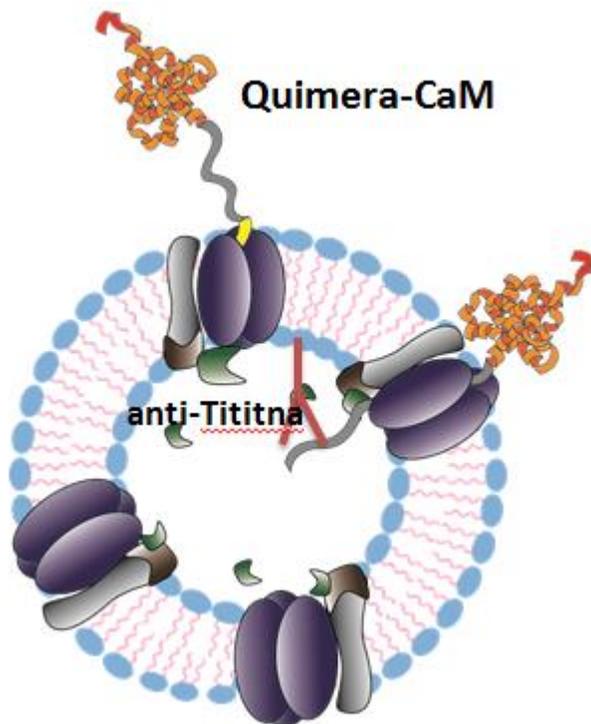


Figura 32.- Esquema de translocación con la proteína quimérica CaM usando un anti-Titina.

9.- MATERIAL SUPLEMENTARIO

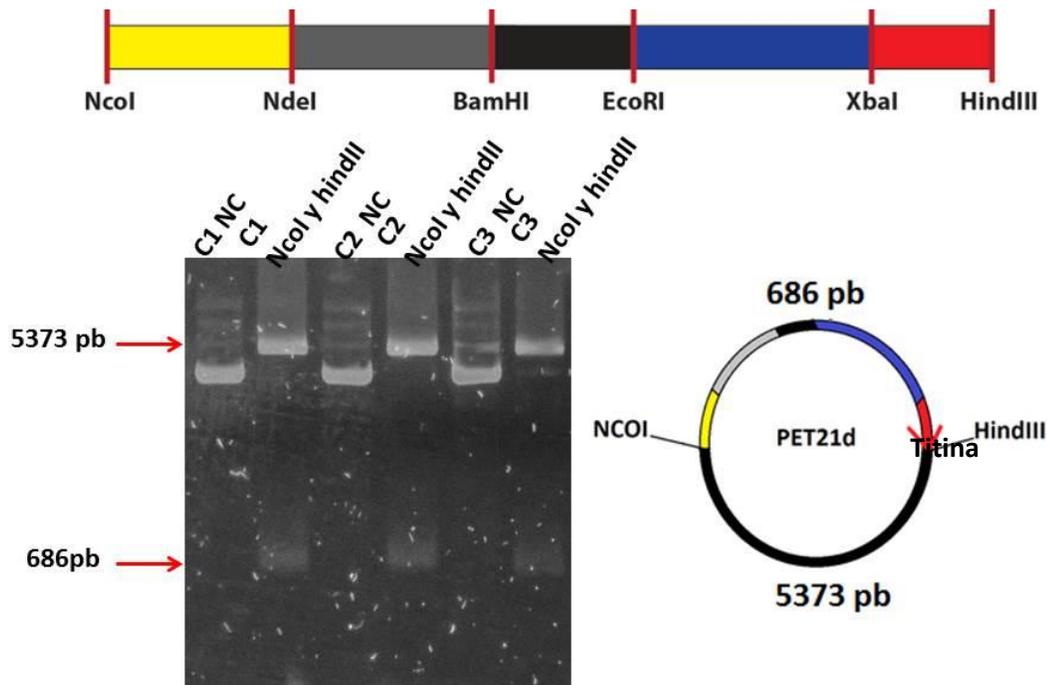


Figura 33.- Colonias positivas del subclonamiento de secuencia nucleotídica sintética de translocación con Titina en el plásmido de expresión pET21d. En este resultado se observa el ADN proveniente de 3 colonias positivas que fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y HindIII, luego del subclonamiento de la secuencia sintética de translocación con Titina en el vector de expresión pET21d, observándose las bandas esperadas de 686 pb y 5373 pb mediante un análisis de la secuencia en el programa informático Vector NTI. gel de agarosa 0.8% teñido con Gel Red.

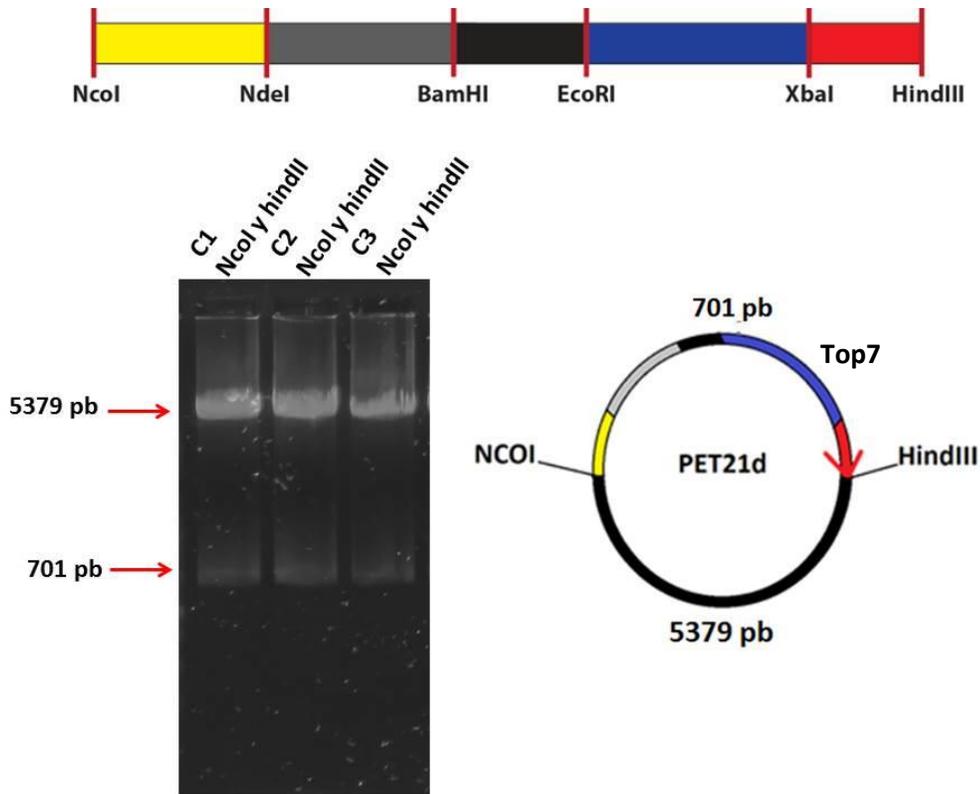


Figura 34.- Colonias positivas del subclonamiento de secuencia nucleotídica sintética de translocación con Top7 en el plásmido de expresión pET21d. En este resultado se observa el ADN proveniente de 3 colonias positivas que fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y HindIII, luego del subclonamiento de la secuencia sintética de translocación con Top7 en el vector de expresión pET21d, observándose las bandas esperadas de 701 pb y 5379 pb mediante un análisis de la secuencia en el programa informático Vector NTI. gel de agarosa 0.8% teñido con Gel Red.

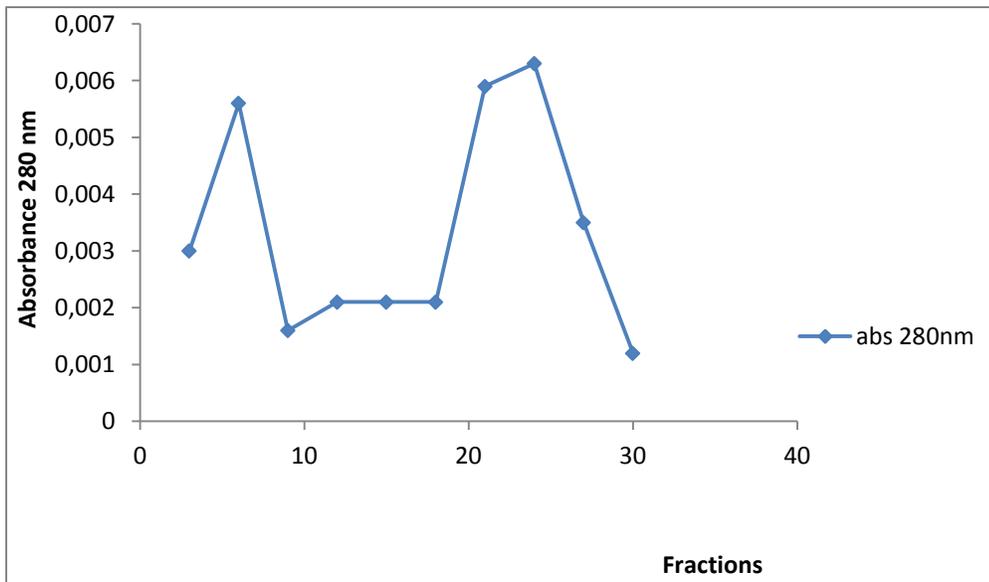


Figura 35.- Grafico de absorbancia 280 nm versus las fracciones obtenidas en columna de exclusión molecular. En este grafico se observan dos picos, uno entre los tubos 0-10 y otro entre los tubos 20-30.

10.- BIBLIOGRAFIA

- Arora, A., & Tamm, L. K. (2001). Biophysical approaches to membrane protein structure determination. *Curr Opin Struct Biol*, 11(5), 540-547.
- Astumian, R. D. (1997). Thermodynamics and kinetics of a Brownian motor. *Science*, 276(5314), 917-922.
- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., & Frank, J. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science*, 278(5346), 2123-2126.
- Behnke, J., Feige, M. J., & Hendershot, L. M. (2015). BiP and its nucleotide exchange factors Grp170 and Sil1: mechanisms of action and biological functions. *J Mol Biol*, 427(7), 1589-1608. doi: 10.1016/j.jmb.2015.02.011
- Blobel, G., & Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol*, 67(3), 852-862.
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S. E., Dower, W. J., Lipshutz, R. J., Sprang, S. R., Sambrook, J. F., & Gething, M. J. (1993). Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*, 75(4), 717-728.
- Brodsky, J. L., Hamamoto, S., Feldheim, D., & Schekman, R. (1993). Reconstitution of protein translocation from solubilized yeast membranes reveals topologically distinct roles for BiP and cytosolic Hsc70. *J Cell Biol*, 120(1), 95-102. doi: 10.1083/jcb.120.1.95
- Bush, G. L., Tassin, A. M., Friden, H., & Meyer, D. I. (1991). Secretion in yeast. Purification and in vitro translocation of chemical amounts of prepro-alpha-factor. *J Biol Chem*, 266(21), 13811-13814.
- Bustamante, C., Chemla, Y. R., Forde, N. R., & Izhaky, D. (2004). Mechanical processes in biochemistry. *Annu Rev Biochem*, 73, 705-748. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161542
- Chirico, W. J., Waters, M. G., & Blobel, G. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, 332(6167), 805-810. doi: 10.1038/332805a0
- Choi, B., & Zocchi, G. (2007). Guanylate kinase, induced fit, and the allosteric spring probe. *Biophys J*, 92(5), 1651-1658. doi: 10.1529/biophysj.106.092866
- Fernandez, F. S., Trombetta, S. E., Hellman, U., & Parodi, A. J. (1994). Purification to homogeneity of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase from *Schizosaccharomyces pombe* and apparent absence of the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 269(48), 30701-30706.
- Goldman, D. H., Kaiser, C. M., Milin, A., Righini, M., Tinoco, I., Jr., & Bustamante, C. (2015). Ribosome. Mechanical force releases nascent chain-mediated ribosome arrest in vitro and in vivo. *Science*, 348(6233), 457-460. doi: 10.1126/science.1261909
- Gorlich, D., & Rapoport, T. A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 75(4), 615-630.
- Harada, Y., Li, H., Wall, J. S., Li, H., & Lennarz, W. J. (2011). Structural studies and the assembly of the heptameric post-translational translocon complex. *J Biol Chem*, 286(4), 2956-2965. doi: 10.1074/jbc.M110.159517
- Hendershot, L. M. (2004). The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med*, 71(5), 289-297.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23-28.

- Itskanov, S., & Park, E. (2019). Structure of the posttranslational Sec protein-translocation channel complex from yeast. *Science*, *363*(6422), 84-87. doi: 10.1126/science.aav6740
- Johnson, N., Powis, K., & High, S. (2013). Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, *1833*(11), 2403-2409. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.12.008
- Jung, S. J., Kim, J. E., Reithinger, J. H., & Kim, H. (2014). The Sec62-Sec63 translocon facilitates translocation of the C-terminus of membrane proteins. *J Cell Sci*, *127*(Pt 19), 4270-4278. doi: 10.1242/jcs.153650
- Jungnickel, B., Rapoport, T. A., & Hartmann, E. (1994). Protein translocation: common themes from bacteria to man. *FEBS Lett*, *346*(1), 73-77.
- Junker, J. P., Ziegler, F., & Rief, M. (2009). Ligand-dependent equilibrium fluctuations of single calmodulin molecules. *Science*, *323*(5914), 633-637. doi: 10.1126/science.1166191
- Kaiser, C. A., Preuss, D., Grisafi, P., & Botstein, D. (1987). Many Random Sequences Functionally Replace the Secretion Signal Sequence of Yeast Invertase. *Science*, *235*(4786), 312-317. doi: DOI 10.1126/science.3541205
- Lecker, S., Meyer, D., & Wickner, W. (1989). Export of prepro-alpha-factor from Escherichia coli. *J Biol Chem*, *264*(3), 1882-1886.
- Liebermeister, W., Rapoport, T. A., & Heinrich, R. (2001). Ratcheting in post-translational protein translocation: a mathematical model. *J Mol Biol*, *305*(3), 643-656. doi: 10.1006/jmbi.2000.4302
- Lyman, S. K., & Schekman, R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell*, *88*(1), 85-96.
- Mandon, E. C., Trueman, S. F., & Gilmore, R. (2013). Protein translocation across the rough endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *5*(2). doi: 10.1101/cshperspect.a013342
- Marcinowski, M., Holler, M., Feige, M. J., Baerend, D., Lamb, D. C., & Buchner, J. (2011). Substrate discrimination of the chaperone BiP by autonomous and cochaperone-regulated conformational transitions. *Nat Struct Mol Biol*, *18*(2), 150-158. doi: 10.1038/nsmb.1970
- Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K., & Rapoport, T. A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell*, *97*(5), 553-564.
- Misselwitz, B., Staeck, O., Matlack, K. E., & Rapoport, T. A. (1999). Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J Biol Chem*, *274*(29), 20110-20115.
- Nakai, M. (2018). New Perspectives on Chloroplast Protein Import. *Plant Cell Physiol*, *59*(6), 1111-1119. doi: 10.1093/pcp/pcy083
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, *189*(4206), 867. doi: 10.1126/science.189.4206.867-b
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., & Rapoport, T. A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, *81*(4), 561-570.
- Pilon, M., Romisch, K., Quach, D., & Schekman, R. (1998). Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell*, *9*(12), 3455-3473.
- Ramirez, M. P., Rivera, M., Quiroga-Roger, D., Bustamante, A., Vega, M., Baez, M., . . . Wilson, C. A. M. (2017). Single molecule force spectroscopy reveals the effect of BiP chaperone on protein folding. *Protein Sci*, *26*(7), 1404-1412. doi: 10.1002/pro.3137
- Rapoport, T. A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, *450*(7170), 663-669. doi: 10.1038/nature06384

- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(6), 1760-1765. doi: 10.1073/pnas.0813167106
- Rios, D. L., D'Onofrio, L. O., Souza, J. K., Queiroz, A. M., Raduy-Maron, L., Silva-Neto, N., . . . Galvao-Castro, B. (2007). Smoking-dependent and haplotype-specific effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on angiographically assessed coronary artery disease in Caucasian- and African-Brazilians. *Atherosclerosis*, *193*(1), 135-141. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.041
- Ruprecht, M., Bionda, T., Sato, T., Sommer, M. S., Endo, T., & Schleiff, E. (2010). On the impact of precursor unfolding during protein import into chloroplasts. *Mol Plant*, *3*(3), 499-508. doi: 10.1093/mp/ssp116
- Sabatini, D., Colman, D., Sabban, E., Sherman, J., Morimoto, T., Kreibich, G., & Adesnik, M. (1982). Mechanisms for the incorporation of proteins into the plasma membrane. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *46 Pt 2*, 807-818.
- San Martin, A., Rodriguez-Aliaga, P., Molina, J. A., Martin, A., Bustamante, C., & Baez, M. (2017). Knots can impair protein degradation by ATP-dependent proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(37), 9864-9869. doi: 10.1073/pnas.1705916114
- Schekman, R. (1994). Translocation gets a push. *Cell*, *78*(6), 911-913.
- Shao, S., & Hegde, R. S. (2011). A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. *Cell*, *147*(7), 1576-1588. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.048
- Smith, D. E., Tans, S. J., Smith, S. B., Grimes, S., Anderson, D. L., & Bustamante, C. (2001). The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*, *413*(6857), 748-752. doi: 10.1038/35099581
- Strayle, J., Pozzan, T., & Rudolph, H. K. (1999). Steady-state free Ca(2+) in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 microM and is mainly controlled by the secretory pathway pump pmr1. *EMBO J*, *18*(17), 4733-4743. doi: 10.1093/emboj/18.17.4733
- Van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., & Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, *427*(6969), 36-44. doi: 10.1038/nature02218
- Vembar, S. S., Jonikas, M. C., Hendershot, L. M., Weissman, J. S., & Brodsky, J. L. (2010). J domain co-chaperone specificity defines the role of BiP during protein translocation. *J Biol Chem*, *285*(29), 22484-22494. doi: 10.1074/jbc.M110.102186
- Vogel, J. P., Misra, L. M., & Rose, M. D. (1990). Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J Cell Biol*, *110*(6), 1885-1895. doi: 10.1083/jcb.110.6.1885
- Wagoner, J. A., & Dill, K. A. (2016). Molecular Motors: Power Strokes Outperform Brownian Ratchets. *J Phys Chem B*, *120*(26), 6327-6336. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b02776
- Wang, H., & Oster, G. (2002). Ratchets, power strokes, and molecular motors. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, *75*(2), 315-323. doi: 10.1007/s003390201340
- Waters, M. G., Evans, E. A., & Blobel, G. (1988). Prepro-Alpha-Factor Has a Cleavable Signal Sequence. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(13), 6209-6214.
- Wu, X., Cabanos, C., & Rapoport, T. A. (2019). Structure of the post-translational protein translocation machinery of the ER membrane. *Nature*, *566*(7742), 136-139. doi: 10.1038/s41586-018-0856-x
- Yamano, K., Kuroyanagi-Hasegawa, M., Esaki, M., Yokota, M., & Endo, T. (2008). Step-size analyses of the mitochondrial Hsp70 import motor reveal the Brownian ratchet in operation. *J Biol Chem*, *283*(40), 27325-27332. doi: 10.1074/jbc.M805249200

- Yang, J., Nune, M., Zong, Y., Zhou, L., & Liu, Q. (2015). Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP. *Structure*, 23(12), 2191-2203. doi: 10.1016/j.str.2015.10.012
- Zimmermann, R., Eyrisch, S., Ahmad, M., & Helms, V. (2011). Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1808(3), 912-924. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.06.015