



Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

**Caracterización estructural y funcional
de la interacción entre las chaperonas
CCT y Hsc70**

-Tesis doctoral-

Jorge Cuéllar Pérez

Madrid, 2008





Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Memoria presentada para optar al grado de doctor por:
Jorge Cuéllar Pérez

Directores de Tesis:

Profesor José María Valpuesta
C.N.B.-C.S.I.C.

Profesor José López Carrascosa
C.N.B.-C.S.I.C.

Madrid, Enero de 2008





ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	3
SUMMARY	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. El plegamiento de las proteínas	6
1.2. Las chaperonas moleculares	7
1.3. Proteínas Hsp60 o chaperoninas	8
1.4. Chaperoninas del tipo I	9
1.5. Chaperoninas del tipo II	11
1.6. Estructura de la chaperonina CCT	13
1.7. Sustratos de CCT	15
1.8. Cochaperonas de CCT	18
1.9. Chaperonas de la familia Hsp70	20
1.10. Ciclo funcional de las proteínas Hsp70	21
1.11. Estructura y composición de las chaperonas Hsp70	23
1.12. Cofactores y cochaperonas de Hsp70	27
1.13. Proceso de colaboración de las chaperonas Hsp60 y Hsp70 en el plegamiento de proteínas	31
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Purificación de CCT de testículo de toro	36
3.2. Purificación de Hsc70 Δ C	37
3.3. Ensayo de interacción entre chaperoninas y chaperonas Hsp70/Hsp110	39
3.4. Ensayo de interacción de CCT y Hsc70 Δ C	40
3.5. Preparación y purificación de los dominios Hsc70 _{NBD} y Hsc70 _{PBD}	41
3.6. Identificación de los dominios Hsc70 _{NBD} y Hsc70 _{PBD} por MALDI-TOF	42
3.7. Purificación de DnaK silvestre	43
3.8. Purificación de DnaK _{NBD}	44

3.9. Preparación de muestras para microscopía electrónica	44
3.10. Preparación de muestras para inmunomicroscopía	45
3.11. Preparación de muestras para criomicroscopía electrónica	45
3.12. Digitalización	45
3.13. Procesamiento de imágenes procedentes de tinción negativa	46
3.14. Reconstrucción tridimensional del complejo CCT:Hsc70 _{NBD}	46
3.15. Ajuste de la estructura atómica de Hsc70 _{NBD} en la reconstrucción tridimensional de los complejos CCT:Hsc70 _{NBD}	47
3.16. Alineamiento de secuencias y relaciones filogenéticas	47
3.17. Dicroísmo circular	48
3.18. Actividad ATPasa	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Purificación de CCT	50
4.2. Ensayo de interacción de CCT y Hsp70/Hsc70	51
4.3. Purificación de Hsc70 Δ C	53
4.4. Ensayo de interacción de CCT y Hsc70 Δ C por filtración en gel	54
4.5. Preparación y purificación de los dominios NBD y PBD de Hsc70 Δ C	55
4.6. Ensayo de interacción de CCT con Hsc70 _{NBD} y Hsc70 _{PBD}	58
4.7. Procesamiento bidimensional de los complejos CCT:Hsc70 _{NBD}	59
4.8. Reconstrucción tridimensional de los complejos CCT:Hsc70 _{NBD}	60
4.9. Ajuste de la estructura atómica de Hsc70 _{NBD} en la reconstrucción tridimensional de CCT:Hsc70 _{NBD}	63
4.10. La interacción entre Hsp60 y Hsp70 sólo se produce en organismos eucariotas	64
4.11. Ensayo de interacción de CCT y los mutantes de Hsc70 Δ C	67
4.12. Ensayo de interacción de CCT y el mutante de DnaK	69
5. DISCUSIÓN	71
5.1. Interacción específica entre los miembros eucariotas de Hsp60 y Hsp70	72
5.2. Mecanismo de interacción entre CCT y Hsc70	77
6. CONCLUSIONES	80
7. BIBLIOGRAFÍA	82



ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bincicónico
BSA	Seroalbúmina bovina
CCT	Chaperonina que contiene TCP-1
CD	Dicroísmo circular
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamínico tetraacético
EEVD	Glutámico-glutámico-valina-aspártico
FPLC	Cromatografía líquida rápida
HEPES	Ácido N-(2-hidroxiethyl)piperacina-N'-2-etanosulfónico
HPD	Histidina-prolina-aspártico
Hsc70_{NBD}	Dominio de unión a nucleótido de Hsc70
Hsc70_{PBD}	Dominio de unión a péptido de Hsc70
Hsp	Proteína de choque térmico
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MALDI-TOF	Desorción/Ionización mediante láser asistida por matriz
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PDB	Banco de datos de proteínas
PFD	Prefoldina
PhLP	Proteína similar a la fosducina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PolyQ	Proteínas poliglutaminas
PVDF	Membrana de difluoruro de polivinileno
SDS	Dodecil sulfato sódico
SNaDE	Ensayo de electroforesis semi-nativa
SOM	Mapas auto-organizativos
VHL	Proteína de Von Hippel Lindau

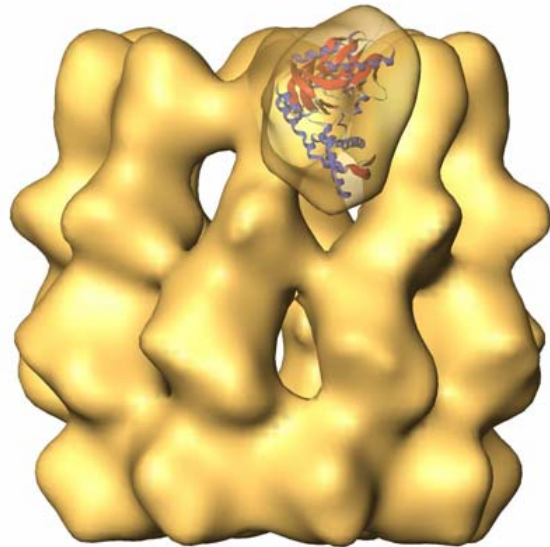


Protein folding is usually a problem in the crowded environment of the cell and nature has devised a group of proteins termed molecular chaperones that assist in the folding of other proteins. Chaperones mostly function by protecting the aggregation-prone regions of their substrates or by providing them with a proper environment so that they can fold by themselves. It is increasingly evident that chaperones work in a coordinate manner in the protein folding pathways, and an example of these networks is the cooperation between chaperones belonging to the Hsp60 (Heat shock protein 60) and Hsp70 families. Hsp60 chaperones, also termed chaperonins, are large multimers (800-1000 kDa) composed of ~ 60 kDa subunits usually arranged in two back-to-back rings, each one enclosing a cavity where folding takes place. Chaperonins are found in all organisms and are classified in two different types. Type I chaperonins are found in eubacteria, mitochondria and chloroplasts, where they form homo-heptameric structures, epitomized by the chaperonin GroEL from *E. coli*. The second type of chaperonins is found in archaea, where they can form octamers or nonamers composed of 1-3 different subunits. However the most complex of these chaperonins is found in the eukaryotic cytosol and is termed CCT (Chaperonin Containing TCP-1; also termed TRiC). CCT is composed of eight different subunits. CCT, unlike the rest of chaperonins, seems to play a more specialized role in the folding of proteins.

The Hsp70 family of chaperones is conserved in all organisms except archaea, and assists the folding and disaggregation of proteins. These chaperones bind to the unfolded protein using an ATP-driven mechanism which controls and is controlled by the allosteric interactions between their N-terminal, ATP-binding domain (NBD) and their C-terminal, protein-binding domain (PBD). In the mammalian cytosol there are two types of Hsp70 chaperones, the constitutive isoform termed Hsc70 in mammals, and Hsp70, which is expressed under stress conditions.

This thesis shows the formation of a stable complex between CCT and Hsc70, two eukaryotic representatives of these chaperone families. This interaction takes place between the apical domain of the CCT β subunit and the nucleotide binding domain of Hsc70. A similar interaction does not occur between their prokaryotic counterparts GroEL and DnaK, suggesting that the two types of chaperones have evolved in eukarya to make their cooperative folding task more efficient.

1. Introducción





1.1. El plegamiento de las proteínas.

Las proteínas desempeñan un papel principal en todos los procesos biológicos. Esta gama considerable de funciones diferentes se debe a la posibilidad de plegamiento de las proteínas en estructuras tridimensionales muy diversas. Éstas se consiguen mediante la combinación de una serie de estructuras ordenadas como son las estructuras en hélice α ó las láminas β que pueden dar lugar a estructuras más complejas (estructuras superhelicoidales, hojas β , dominios $\alpha\beta$, etc.). Desde los años cincuenta numerosos científicos han estudiado los mecanismos por los cuales las proteínas adquieren su estructura activa y que lleva aparejada una función única. Mucho se ha investigado desde entonces en este campo y bastantes avances se han producido, entre ellos los descubrimientos realizados por Anfinsen y colaboradores que mostraron que la información necesaria para que una proteína alcance su estructura nativa se encuentra en su propia secuencia aminoacídica (Anfinsen, 1973). Sin embargo, esta condición es necesaria pero no siempre suficiente, y es que hay ocasiones en las que las proteínas no pueden alcanzar su conformación funcional por sí mismas debido a una serie de factores. Uno muy importante y que sólo desde hace poco tiempo ha empezado a tenerse en cuenta, es la alta concentración de macromoléculas existente en la célula (200-400 mg/ml), muy alejada de las condiciones usadas *in vitro*, y que puede producir interacciones no deseadas entre las proteínas que están siendo sintetizadas. Es también posible que una vez que una proteína ha adoptado su estructura terciaria, se vea sometida a situaciones de estrés (temperatura, pH, radicales, etc.) que provoquen la pérdida de su conformación nativa. Otros procesos de interés fisiológico como el transporte proteico a través de orgánulos o la activación/desactivación enzimática requieren también cambios conformacionales. Para contrarrestar la tendencia de los polipéptidos en conformación no nativa a agregar en la célula, los organismos disponen de un sofisticado sistema del que unas proteínas llamadas chaperonas moleculares forman parte esencial.

1.2. Las chaperonas moleculares.

Tanto *in vivo* como *in vitro*, la transición de una proteína desde su estado no plegado a su conformación nativa frecuentemente es el resultado de la interacción con una serie de proteínas denominadas chaperonas moleculares.

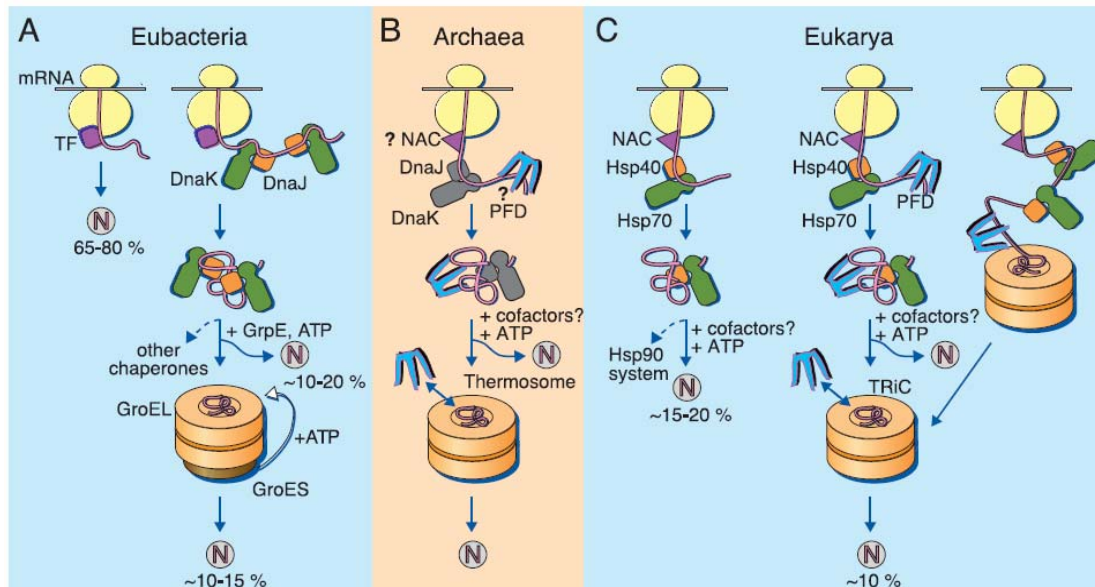


Figura 1.1: Modelo de plegamiento asistido por chaperonas de las cadenas polipeptídicas sintetizadas en el citosol (Hartl y Hayer-Hartl, 2002). (A) En el caso de la Eubacteria, las cadenas nacientes interactúan con TF (del inglés Trigger factor). Las proteínas pequeñas (65 a 80% del total) son capaces de plegarse rápidamente por sí mismas hasta llegar a la conformación nativa (N). Las cadenas más largas interactúan con el sistema de chaperonas DnaK/DnaJ. A partir de este momento, muchas proteínas son capaces de plegarse tras varios ciclos de interacción, y entre un 10 y un 15% del total son cedidas al sistema GroEL/GroES. (B) En el caso de las Arqueobacterias, no todos los organismos contienen DnaK y DnaJ. No se ha comprobado la existencia de NAC (complejo asociado a la cadena naciente). Muchas proteínas son asistidas por la chaperona PFD (prefoldina) o por el termosoma. (C) En el caso de los Eucariotas, en lugar de TF poseen NAC. La mayoría de las cadenas pueden autoplegarse. Entre un 15 y un 20% de las cadenas se repliegan asistidas por el sistema Hsp70/Hsp40, homólogo de DnaK/DnaJ. Una fracción de las proteínas desnaturizadas son transferidas a las chaperonas Hsp90 para terminar el plegamiento. En torno al 10% de las proteínas son transferidas a la chaperonina CCT (o TRiC) desde Hsp70 ya sea co- o postraduccionalmente. En este paso también interviene PFD.

El término chaperona molecular proviene de la palabra francesa *chaperonne* cuya traducción al castellano sería “señorita de compañía” o “carabina”. Se utilizó por primera vez para describir la función de la nucleoplasmina, una proteína ácida nuclear requerida para el ensamblaje de nucleosomas de ADN e histonas en extractos de huevos de *Xenopus* (Laskey y cols., 1978). La nucleoplasmina se une transitoriamente a las histonas, con lo que reduce su carga positiva e inhibe la tendencia de éstas a interactuar inespecíficamente con el ADN, molécula cargada negativamente. La nucleoplasmina no proporciona información estérica a las histonas para que se plieguen



adecuadamente ni es un componente estructural de los nucleosomas, pero su interacción con las histonas permite que las propiedades de autoplegamiento de éstas predominen sobre la tendencia a unirse al ADN debido a sus cargas opuestas. El mecanismo de la nucleoplasmina como chaperona molecular se puede extender a todas las chaperonas conocidas. De esta manera, la función principal de las chaperonas moleculares es reconocer y seleccionar su unión a péptidos de nueva síntesis que esperan alcanzar su conformación nativa, formando complejos relativamente estables (Figura 1.1). En la mayoría de los casos, los complejos se disocian por la unión e hidrólisis de ATP. Muchas chaperonas moleculares están involucradas en la formación de complejos multiproteicos. Se ha descrito la conservación evolutiva de más de 20 familias diferentes de chaperonas moleculares, muchas de ellas consideradas proteínas de choque térmico (Hsp; del inglés *heat shock protein*), en arqueobacterias, procariotas y eucariotas. Así mismo, se han observado chaperonas específicas de función, de tipo celular y de orgánulo (Hartl y cols., 1996).

Dentro del contexto del proceso de plegamiento de proteínas *in vivo*, las chaperonas previenen la agregación de conformaciones no nativas y mantienen a las proteínas en las pautas necesarias para su plegamiento correcto. Por otro lado, varias chaperonas pueden mantener a proteínas de nueva síntesis en una conformación no nativa para poder transportarlas a través de membranas celulares, orgánulos, así como unirse a proteínas no nativas durante el estrés celular. Este proceso tiene lugar en la mayoría de las proteínas, sino en todas, ya que las proteínas interactúan con alguna chaperona en alguna etapa de su plegamiento. Así, la importancia de las chaperonas moleculares nace de la necesidad de prevenir la agregación durante el plegamiento de cadenas polipeptídicas recién sintetizadas, de prevenir interacciones no deseadas con otros componentes celulares, de dirigir el ensamblaje de proteínas de gran tamaño y complejos multiproteicos y, durante situaciones de estrés, de potenciar el plegamiento de numerosas proteínas (Young y cols., 2004).

1.3. Proteínas Hsp60 o chaperoninas.

Dentro de la familia de chaperonas moleculares existe un gran número de subfamilias, muchas de ellas sin ningún parentesco entre sí. Dentro de esta familia de proteínas se encuentran las chaperonas Hsp60 o chaperoninas, que aíslan en su interior al sustrato y



crean el entorno adecuado para que la proteína adopte su conformación nativa (Ellis y cols., 1996).

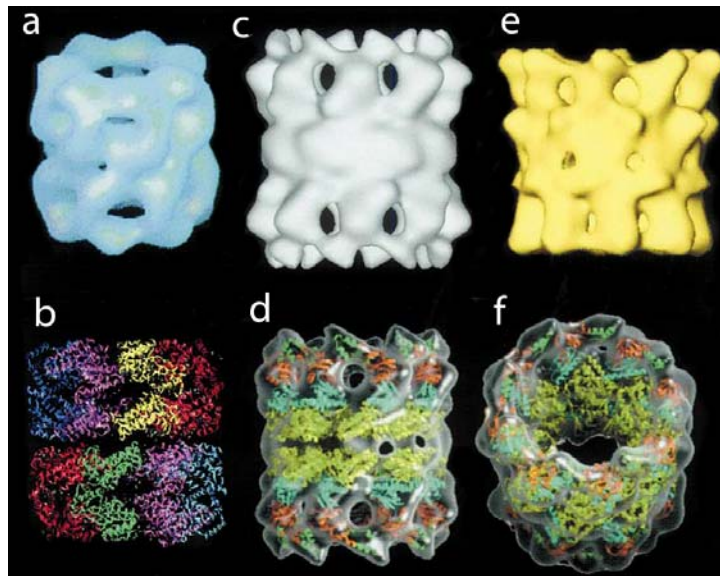


Figura 1.2: Estructura tridimensional de los diferentes tipos de Chaperoninas (Carrascosa y cols, 2001). En la parte superior se muestra las reconstrucciones tridimensionales obtenidas por criomicroscopía de: (a) GroEL (Roseman y cols, 1996); (e) Termosoma (Nitsch y cols, 1998); y (c) CCT (Llorca y cols, 1999a). En (b) se muestra la estructura atómica de GroEL (Braig y cols, 1994), mientras que en (d) y (f) se muestran dos vistas del ajuste de la estructura atómica modificada del termosoma (Ditzel y cols., 1998) en la reconstrucción tridimensional del termosoma mostrado en (e).

Las chaperoninas son grandes multímeros moleculares compuestos por proteínas de un peso molecular cercano a 60 kDa (Figura 2.1). Todas las chaperoninas tienen una estructura oligomérica característica en forma de doble anillo dispuestos espalda contra espalda, pero pueden diferir entre sí en el número y tipo de subunidades que componen cada anillo. A diferencia de otras chaperonas que unen segmentos de la cadena polipeptídica, las chaperoninas pueden interactuar con la totalidad de la secuencia polipeptídica, gracias a su estructura hueca y oligomérica. Las chaperoninas se dividen en dos grupos, atendiendo a una serie de consideraciones.

1.4. Chaperoninas del tipo I.

Son las chaperoninas más conocidas y estudiadas hasta la fecha, y se encuentran en eubacterias y orgánulos eucarióticos (mitocondrias y cloroplastos). Todas las chaperoninas de este grupo tienen una estructura muy parecida (Figura 1.2a y 1.2b), un cilindro constituido por uno ó dos anillos heptaméricos que funcionan en colaboración

con otro pequeño oligómero llamado comúnmente cochaperonina, que se une a la chaperonina en momentos determinados de su ciclo (Figura 1.3b).

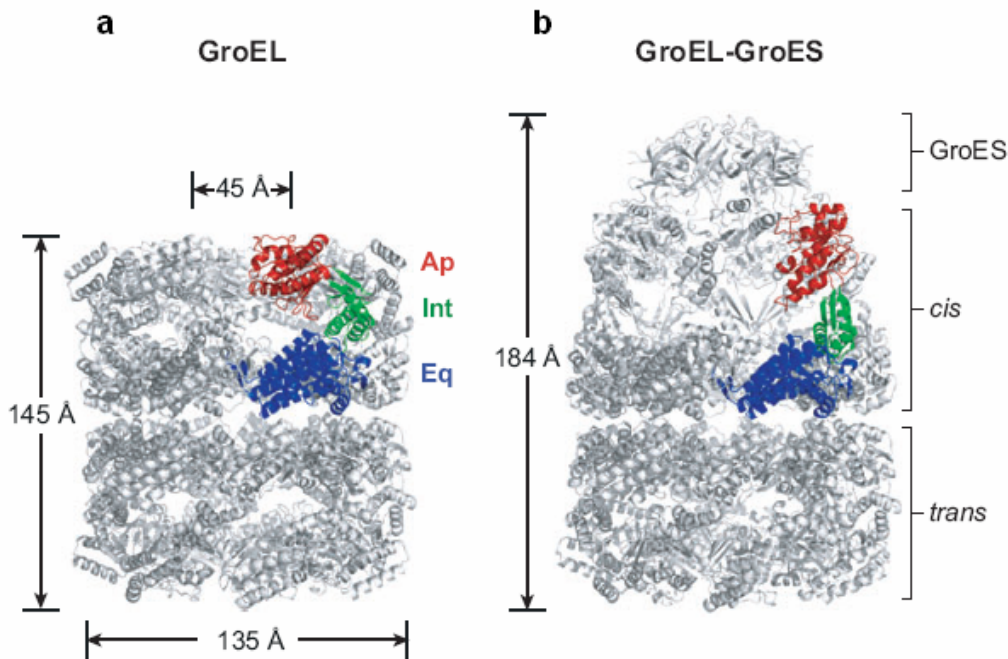


Figura 1.3: Arquitectura típica de las chaperoninas de tipo I (Braig y cols., 1994). (a) Modelo cristalográfico de la proteína GroEL de *Escherichia coli*, (número de entrada en pdb:1OEL). Los tres dominios de GroEL: Apical, Intermedio y Ecuatorial se muestran en colores diferentes (rojo, verde y azul, respectivamente). (b) Modelo cristalográfico del complejo formado entre GroEL y GroES, (número de entrada en pdb:1AON). Adaptado de Horwich y cols, 2007.

La chaperonina más estudiada dentro de esta familia es GroEL de *Escherichia coli*. Consta de un cilindro formado por dos anillos de siete subunidades idénticas cada uno. El cilindro tiene 145 Å de alto y 135 Å de ancho, y posee una cavidad central de 45 Å de diámetro (Figura 1.3a), (Braig y cols., 1994; Xu y cols., 1997). Estas dimensiones corresponden a la chaperonina libre, sin ATP, y varían dependiendo del momento del ciclo funcional en el que se encuentre la chaperonina. Los dos anillos interactúan por su base y las cavidades que definen cada uno no se comunican, ya que están separadas por los 24 últimos aminoácidos del extremo carboxiterminal (C-terminal) de las siete subunidades, que se disponen hacia el centro del toroide. Cada subunidad se pliega en tres dominios bien diferenciados, que se denominan apical, intermedio y ecuatorial, de acuerdo a su disposición en el oligómero (Figura 1.3a y 3.b). El dominio ecuatorial, que forma la base de la cavidad, posee una estructura muy ordenada, con α -hélices largas y casi paralelas. En este dominio se encuentra el sitio de unión a nucleótido, que se sitúa

en su superficie superior. Además, en él coinciden los extremos N- y C- terminal y contribuye a la mayor parte de las interacciones entre subunidades vecinas del mismo anillo y en todas las que se establecen entre los dos anillos. Por lo tanto, parece que este dominio es el responsable de la comunicación alostérica que se produce en la proteína tras la unión, hidrólisis y liberación del nucleótido (Horovitz y cols., 2001). El dominio intermedio es pequeño y flexible y conecta el dominio ecuatorial con el dominio apical, el cual está situado en la entrada de la cavidad y contiene los residuos implicados en la interacción con el sustrato y su cochaperonina, GroES (Fenton y cols., 1994; Buckle y cols., 1997). La estructura del dominio apical es poco ordenada y flexible, lo que permite adaptarse tanto al sustrato como la cochaperonina GroES (Roseman y cols., 1996; Xu y cols., 1997).

La estructura de GroES es mucho menos compleja que la de GroEL. Se trata de un oligómero con una estructura en forma de anillo constituido por siete subunidades idénticas de 10 kDa cada una (Figura 1.3b), (Hunt y cols., 1996). Cada monómero consiste en un barril β antiparalelo, fuertemente hidrofóbico, y dos horquillas β . Una hebra β de la región amino terminal de cada monómero interacciona con el barril β del monómero adyacente. El oligómero tiene unas dimensiones de 30 Å de altura, 70 Å de anchura y un orificio de 8 Å de diámetro. Una de las horquillas β de cada subunidad se sitúa en la parte superior de la cúpula del oligómero orientada hacia el eje de simetría para formar el llamado techo de la cúpula. La otra horquilla β constituye un lazo móvil flexible dirigido hacia la parte inferior del oligómero y es la zona que forma la interfase entre GroEL y GroES durante la interacción (Xu y cols., 1997).

1.5. Chaperoninas del tipo II

Este tipo de chaperoninas se encuentra en arqueobacterias y en el citoplasma de organismos eucarióticos (Gustche y cols., 1999; Carrascosa y cols., 2001), y aunque posee cierto grado de homología con las chaperoninas del Tipo I, se conoce muy poco de su mecanismo de plegamiento y de sus sustratos. Las chaperoninas de arqueobacterias se denominan termosomas y pueden tener una composición heterogénea, ya que pueden estar compuestas de anillos de ocho ó nueve subunidades, y estos anillos pueden estar a su vez compuestos por 1-3 subunidades distintas. Se conoce

la estructura atómica de varios termosomas (Klumpp y cols., 1997; Ditzel y cols., 1998; Horwich y Saibil, 1998; Bosch y cols., 2000; Steinbacher y Ditzel, 2001; Shomura y cols., 2004) y sus dos principales subunidades constituyentes (α y β) muestran la misma disposición en tres dominios que las chaperoninas del Tipo I, con los dominios ecuatorial, intermedio y apical bien delimitados. La mayor diferencia reside en un fragmento de secuencia que no se encuentra en las chaperoninas del Tipo I, y que se localiza en la punta del dominio apical. Este dominio cierra la cavidad en un momento del ciclo, y desde el punto de vista funcional parece sustituir a la cochaperoninas, inexistentes en este tipo de chaperoninas (Figura 1.4). Los cambios conformacionales que se producen en este tipo de chaperoninas inducidos por la unión de ATP son muy diferentes a los que se producen en el tipo I. En esta chaperona, la unión de ATP promueve pequeños cambios que permiten la unión de su cochaperonina, que es la que posteriormente induce los grandes cambios conformacionales que derivarán en el cierre de la cavidad de la chaperonina (Roseman y cols., 1996; Xu y cols., 1997; Llorca y cols., 1997). La unión de ATP en las chaperoninas del tipo II genera grandes cambios conformacionales en el dominio apical que cierran la entrada del anillo, esto último debido a que la cochaperonina que colabora con la chaperonina del tipo I se ve sustituida en la de tipo II por una hélice del dominio apical que actúa tapando la cavidad durante el ciclo funcional de la chaperonina (Figura 1.4).

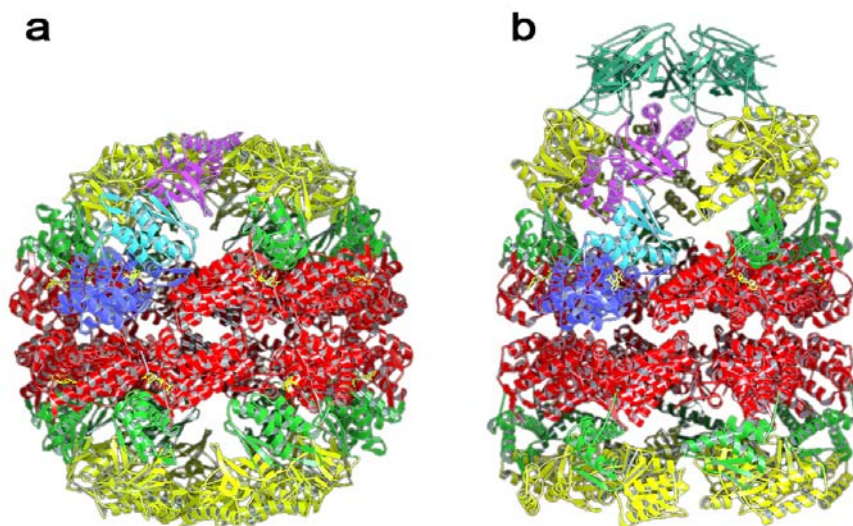


Figura 1.4: Arquitectura típica de las chaperoninas de tipo I y tipo II (Steinbacher y Ditzel, 2001). (a) Vista lateral del termosoma de *T. acidophilum* (Ditzel *et al.*, 1998). Los dominios ecuatoriales están coloreados en rojo, los dominios intermedios en verde y los dominios apicales en amarillo. (b) Vista lateral del complejo asimétrico que forman GroEL–GroES (Xu *et al.*, 1997). Los dominios ecuatoriales, intermedios y apicales están coloreados como en (a).

1.6. Estructura de la chaperonina CCT

La chaperonina que contiene TCP-1 (CCT; del inglés *Chaperonin Containing TCP-1*; también denominada TRiC) es la única proteína de la familia Hsp60 que se encuentra en el citoplasma de los organismos eucariotas. Es la más diferente y compleja de todas las chaperoninas, porque a diferencia del resto posee ocho subunidades diferentes, aunque homólogas, dispuestas de forma precisa dentro del anillo (Liou y Willison, 1997; Willison, 1999) (CCT α , CCT η , CCT δ , CCT θ , CCT γ , CCT β , CCT ζ , CCT ϵ ; CCT1-CCT8 en levadura) (Figura 1.6). Todos los organismos y tejidos estudiados poseen los mismos ocho tipos de subunidades de CCT (Willison y Grantham, 2001), con excepción de testículos de los mamíferos, que poseen una CCT ζ 2 específica (Kubota y cols., 1997). Las diferencias principales entre las distintas subunidades se encuentran en los dominios apicales de cada subunidad, responsables de la unión con el sustrato (Kim y cols., 1994; Pappenberger y cols., 2002). Esta característica sugiere una posible especificidad de unión entre el sustrato y CCT, ausente tanto en GroEL como en termosoma (Figura 1.5), (Llorca y cols., 1999a, 2000 y 2001; Gómez-puertas y cols., 2004). Los estudios realizados en la unión de CCT con sus sustratos indican que la interacción de CCT:sustrato se lleva a cabo a través de subunidades específicas de la chaperonina (Carrascosa y cols., 2001; Llorca y cols., 2000).

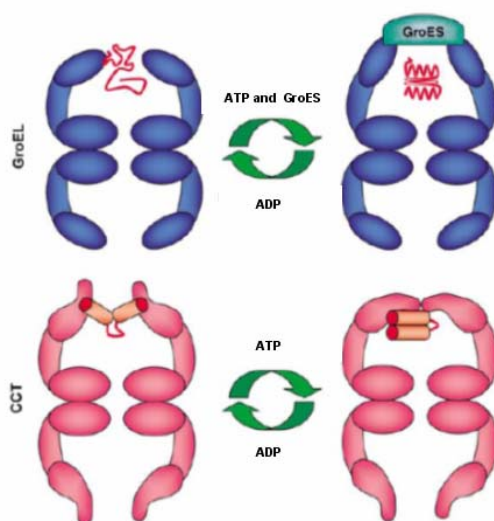


Figura 1.5: Modelo esquemático del mecanismo de plegamiento de CCT y GroEL. (Valpuesta y cols. 2002). En ambas chaperoninas, el ciclo transita desde una conformación abierta donde se produce la interacción con el sustrato y una conformación cerrada. En GroEL, el reconocimiento y la unión del sustrato se produce a través de regiones hidrofóbicas situadas en los dominios apicales de las subunidades de GroEL que reconocen cualquier tipo de conformación no plegada de proteínas que poseen zonas expuestas de residuos hidrofóbicos. La conformación cerrada se produce gracias a la unión de ATP y la cochaperonina GroES. En CCT, los dominios apicales de las diferentes subunidades de CCT reconocen, al menos para actina y tubulina, una determinada conformación del sustrato. El cierre de la cavidad es inducido por la unión de ATP y se produce gracias a las protusiones helicoidales que presentan los dominios apicales de CCT. El sustrato permanece en el interior de la cavidad hasta que éste alcanza su conformación nativa.

Varias estructuras de CCT han sido determinadas por criomicroscopía a 20-30 Å de resolución (Llorca y cols., 1999a, 1999b, 2000; Martín-Benito y cols., 2002, 2004, 2007) y muestran una gran similitud con el resto de chaperoninas del Tipo II (Figura 1.6) (Ditzel y cols., 1998; Nitsch y cols., 1998). CCT es un cilindro con forma de barril cuyo diámetro es de aproximadamente 150 Å y su altura alcanza unos 160 Å. A diferencia de las chaperoninas del Tipo I (Braig y cols., 1994; Xu y cols., 1997), cada subunidad contacta con una única subunidad del anillo opuesto (Ditzel y cols., 1998; Llorca y cols., 1999a).

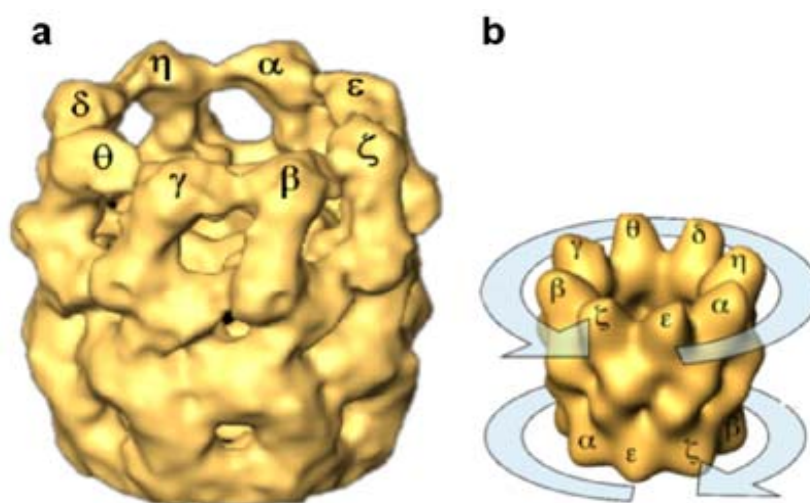


Figura 1.6: Estructura de CCT. (a) Vista lateral de la reconstrucción tridimensional de CCT libre de sustrato en la que se muestra la disposición de las diferentes subunidades de CCT dentro de un mismo anillo según Liou y Willison (1997). (b) Disposición de las subunidades entre los dos anillos que forman el oligómero de CCT según Martín-Benito y cols., 2007. Las flechas de color azul indican el mecanismo de señalización que se produce entre las diferentes subunidades de CCT. Una vez finalizado el ciclo en el anillo superior, CCT ζ transmitiría una señal a CCT ϵ del anillo inferior y comenzaría así, un nuevo ciclo de señalización.

Uno de los aspectos más estudiados durante los últimos años ha sido la disposición de las subunidades entre los dos anillos que forman la estructura de CCT. En las chaperoninas los cambios conformacionales están controlados por señales alostéricas originadas con la unión e hidrólisis de ATP (Horovitz y Willison, 2005). Estos cambios conformacionales están gobernados por un mecanismo de cooperatividad positiva intranular y cooperatividad negativa inter-anular (Horovitz y Willison, 2005). GroEL muestra una clara cooperatividad positiva ya que, los cambios conformacionales que se producen en sus siete subunidades idénticas están completamente concertados. Este

comportamiento también está presente en CCT pero las transiciones alostéricas son secuenciales (Kafri y Horovitz, 2003). Este hecho ha sido confirmado, en parte, mediante experimentos de microscopía electrónica utilizando distintas concentraciones de ATP, que han mostrado que los cambios conformacionales ocurren de forma secuencial desde las subunidades CCT α / η / δ / θ hasta la subunidad CCT β (Rivenzon-Segal y cols., 2005). Experimentos genéticos en los que se han mutado el dominio de unión a ATP de varias subunidades de CCT, han mostrado que la unión e hidrólisis de ATP ocurre de forma jerárquica, empezando en CCT α y terminando en CCT β (Lin y Sherman, 1997). Con estas observaciones y teniendo en cuenta la disposición de las subunidades dentro de un anillo (Figura 1.6a) (Liou y Willison, 1997) parece claro que la cascada secuencial dependiente de ATP podría comenzar en CCT α ó CCT ϵ y terminaría en CCT ζ ó en CCT ϵ , respectivamente. Recientemente se han obtenido por criomicroscopía electrónica dos volúmenes tridimensionales de los complejos CCT:anti-CCT ϵ y CCT:anti-CCT δ que muestran una única disposición inter-anular que permitiría comenzar y terminar el ciclo dependiente de ATP en las mismas subunidades de los dos anillos (Figura 1.6b) (Martín-Benito, 2007). Este hecho sugiere que el ciclo comenzaría en CCT ϵ y finalizaría en CCT ζ . Esta última se encuentra enfrentada a CCT ϵ del anillo opuesto y parece muy tentador sugerir la posibilidad de que CCT ζ pasase a la subunidad CCT ϵ del anillo opuesto algún tipo de señal para que se produjeran en este anillo los mismos cambios secuenciales (Figura 1.6b).

1.7. Sustratos de CCT

Hasta ahora la mayor parte de los estudios que se han realizado sobre la unión de CCT a sus sustratos se han llevado a cabo con las proteínas del citoesqueleto, actina y tubulina. Se sabe que la interacción con CCT es imprescindible para el completo plegamiento de estas dos proteínas (Sternlicht y cols., 1993). Mediante microscopía electrónica de complejos CCT:actina y CCT:tubulina, se ha observado que estas dos proteínas interaccionan con CCT en una conformación cuasi-nativa (Figura 1.7) (Llorca y cols., 1999a, 2000; Gómez-Puertas y cols., 2004).

En el caso de actina (Figura 1.7.a), la interacción de sus dos dominios (llamados pequeño y grande; Kabsch y cols., 1990) se produce con dos lados opuestos de la

cavidad de la chaperonina, siguiendo una disposición 1,4 con respecto a las subunidades de CCT (Figura 1.7.c) (Llorca y cols., 1999a). Experimentos de inmunomicroscopía con anticuerpos específicos contra varias subunidades de CCT han demostrado que el dominio pequeño de la actina interactúa con la subunidad CCT δ y que el dominio grande lo hace con CCT β y CCT ϵ (Figura 1.6.c) (Llorca y cols., 1999b).

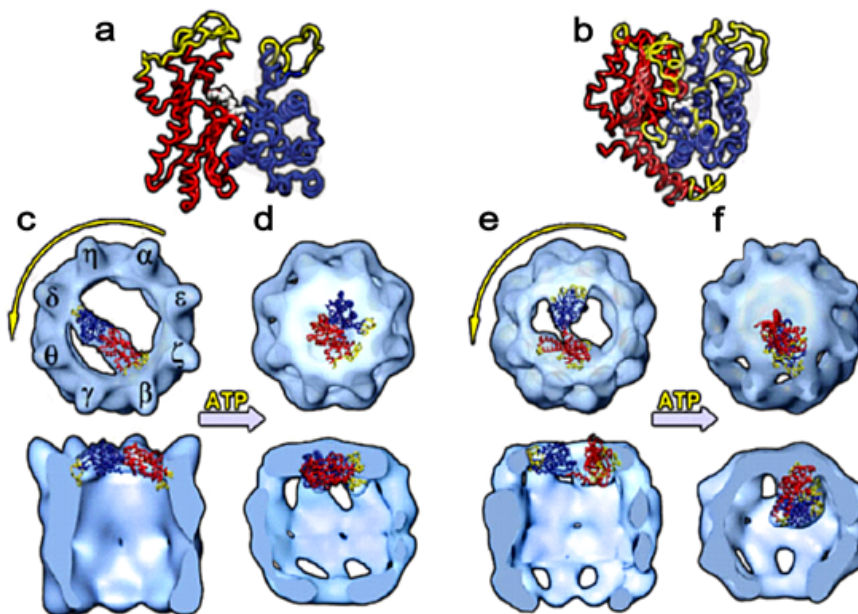


Figura 1.7: Interacción de CCT con actina y tubulina (Gómez-Puertas y cols, 2004). (A) Estructura atómica de actina (Kabsch y cols, 1990). Los dominios en amarillo corresponden a los sitios de unión a CCT. El dominio pequeño de actina está coloreado en rojo y el dominio grande en azul. El dominio pequeño está compuesto por la región N-terminal y los últimos 35 residuos del C-terminal. (B) Estructura atómica de tubulina (Nogales y cols, 1998). Los colores utilizados para los dominios N-terminal, C-terminal y el dominio de unión a CCT son el rojo, azul y amarillo, respectivamente. (C) y (E) Reconstrucciones tridimensionales de los complejos CCT:actina y CCT:tubulina respectivamente, en una conformación abierta (sin nucleótido); vistas frontales en la parte superior y cortes longitudinales de las vistas laterales en la parte inferior. (D) y (F) Reconstrucciones tridimensionales de los complejos CCT:actina y CCT:tubulina respectivamente, en presencia de nucleótido, que genera la conformación cerrada de CCT donde tiene lugar el plegamiento. Las estructuras atómicas de actina y tubulina de los cuatro ejemplos fueron ajustadas en el interior de las masas de actina y tubulina de los complejos reconstruidos. En los complejos sin nucleótido, el mejor ajuste de actina y tubulina depende de la adopción de una estructura cuasi-nativa, abierta por la de unión a nucleótido. Adaptado de Llorca y cols, 1999, 2000 2001).

En lo que se refiere a la tubulina, la reconstrucción tridimensional del complejo CCT:tubulina realizada por criomicroscopía ha revelado una interacción similar a la de actina, pero más compleja (Figura 1.7) (Llorca y cols., 2000). Tubulina parece interactuar con CCT a través de dos regiones opuestas de la cavidad de CCT, en dos tipos de orientación. Los experimentos de inmunomicroscopía muestran que en uno de los casos, el dominio N-terminal de tubulina interactúa con CCT ϵ , CCT ζ y CCT β ,

mientras que el dominio C-terminal interacciona con CCT δ y CCT θ . En el otro tipo de interacción, el dominio N-terminal de tubulina interacciona con CCT β , CCT γ y CCT θ , mientras que el dominio C-terminal interacciona con CCT η y CCT α (Figura 1.7) (Llorca y cols., 2000). Esta especificidad (Figura 1.7) (Llorca y cols., 1999, 2000; Rommelaere y cols., 1999; Hynes y cols., 2000; Ritco-Vonsovici y willison, 2000) difiere bastante a lo que ocurre en el proceso asistido por GroEL, donde la interacción con el polipéptido desnaturalizado se produce a través de regiones hidrófobas no específicas, tanto de los dominios apicales de la chaperonina, como regiones hidrófobas expuestas al exterior del sustrato a plegar (Figura 1.5) (Fenton y cols., 1994; Buckle y cols., 1997; Farr y cols., 2000).

A pesar de que históricamente se le ha otorgado a CCT un papel exclusivo en el plegamiento de actinas y tubulinas, hoy en día parece claro que esta chaperonina interacciona con un amplio espectro de proteínas (Willison y Grantham, 2001; Dunn y cols., 2001; Valpuesta y cols., 2002). Algunos de estos sustratos son proteínas citoesqueléticas tales como miosina (Srikakulam y Winkelman, 1999), la subunidad pesada de la meromiosina (HMM), proteínas relacionadas con actina (ARPs), cofilina y el factor-1 de despolimerización de actinas (ADF1). Pero CCT no está sólo involucrada en la asistencia en el plegamiento de proteínas del citoesqueleto, sino que también está relacionada con proteínas implicadas en diferentes procesos celulares. Entre estas proteínas está G β -transducina (Proteína G implicada en la transducción de señales; Kubota y cols., 2005; Lukov y cols., 2005; Humrich y cols., 2005), Plk1 (quinasa implicada en la regulación de la mitosis celular; Liu y cols., 2005), en el ensamblaje de formas no tóxica de proteínas polyQ (Behrends y cols., 2006; Kitamura y cols., 2006; Tam y cols., 2006), varias deacetilasas de histonas (HDACs, implicadas en la regulación de expresión de genes; Guenther y cols., 2002), ciclina E (implicada en la regulación del ciclo celular; Won y cols., 1998), luciferasa (Frydman y cols., 1994) y la proteína supresora de tumores Von-Hippel Lindau (VHL; implicada en la regulación de genes activados por hipoxia; Feldman y cols. 1999, 2003; Spiess y cols., 2006). La unión de CCT con VHL se produce a través de un dominio que contiene varias repeticiones del motivo WD40 (Smith y cols., 1999; Feldman y cols., 2003). En este sentido, Kubota y colaboradores (2003) observaron que CCT reconocía residuos específicos de carácter hidrofóbico situados en las láminas- β que forman la segunda

repetición WD40 de G β transducina. Curiosamente, un análisis proteómico en *Saccharomyces cerevisiae*, muestra un grupo de 21 proteínas que interactúan con CCT y que están involucradas en diferentes procesos celulares, de las cuales 16 tienen en común la presencia de siete motivos WD40 (Ho y cols., 2002). Un estudio de secuencias con las proteínas de *S. cerevisiae* muestra que esta levadura posee 97 proteínas con 3-8 motivos WD40, de las cuales el 17% interactúan con CCT y la mayoría poseen un peso molecular de entre 50-100 kDa. Es posible que CCT tenga un papel diferente que la mera ayuda en el plegamiento de estas proteínas (Valpuesta y cols., 2002). CCT podría intervenir en la regulación de la actividad de estas proteínas al controlar su liberación al citoplasma o en la regulación de la unión con otras proteínas para formar complejos proteicos, como es el caso de VHL (Feldman y cols., 2003) y G β -transducina (Lukov y cols., 2005; Humrich y cols., 2005). Otras proteínas que pueden ser plegadas por CCT son ciertas proteínas virales como la proteína nuclear del virus Epstein-Barr (EBNA-3; Kashub y cols., 1999), la proteína de la cápsida del virus de la hepatitis B (Lingappa y cols., 1994) y la poliproteína Gag del retrovirus tipo D (Hong y cols., 2001). En total, CCT parece asociarse al 9-15% de las proteínas sintetizadas *de novo* (Thulasiraman y cols., 1999).

1.8. Cochaperonas de CCT

CCT no requiere, a diferencia de su homólogo procariota GroEL, de una cochaperonina del tipo GroES para cerrar la cavidad (Figura 1.5). En el caso de CCT, la cavidad se cierra mediante un cambio conformacional de una hélice presente en el extremo del dominio apical. Sin embargo, esto no excluye que pueda haber otras proteínas que colaboren con CCT en el plegamiento de proteínas. Al menos para las proteínas citoesqueléticas actina y tubulina, otra chaperona denominada prefoldina (PFD; también denominada GimC) colabora con CCT a modo de cochaperona en el proceso de plegamiento. PFD es un complejo heterohexamérico que aparece en todos los organismos menos la mayor parte de las eubacterias, y que en eucariotas posee seis subunidades diferentes (Geissler y cols., 1998; Vainberg y cols., 1998; Hartl y Hayer-Hartl, 2002). PFD fue originalmente descrita como chaperona que asiste en el plegamiento y ensamblaje de tubulina en *S. cerevisiae* (Geissler y cols., 1998), y en mamíferos como cochaperona de CCT en el plegamiento de actina (Vainberg y cols., 1998). En arqueas, PFD reconoce a una amplia variedad de sustratos de diferentes

formas y tamaños a través de unas extensiones hidrófobas situadas en los extremos de sus dominios “coiled-coil” (Siegert y cols., 2000; Lundin y cols., 2004;). En eucariotas, PFD interacciona fundamentalmente con actina y tubulina facilitando su transferencia a CCT mediante un contacto físico con la chaperonina (Martín-Benito y cols., 2002). Recientemente, estudios realizados mediante microscopía electrónica con PFD y el termosoma de arqueas han mostrado un mecanismo de actuación en la asistencia en el plegamiento de proteínas similar al de eucariotas. Estos resultados sugieren que existe una coevolución en los sistemas PFD-chaperoninas de arqueas y organismos eucariotas. La gran diferencia erradicaría en que el sistema eucariota habría evolucionado hacia un mecanismo más especializado, facilitando el plegamiento de fundamentalmente dos clases de proteínas, como son actinas y tubulinas, las cuales han sido esenciales en la aparición de un citoesqueleto capaz de soportar la mayor complejidad de los procesos que definen a las células eucariotas (Martín-Benito y cols., 2007).

Otra de las cochaperonas de CCT son las llamadas proteínas similares a la fosducina (del inglés *phosducin like protein*; PhLP). La mayoría de los miembros pertenecientes a la familia de proteínas fosducinas han sido históricamente descritos como reguladores del proceso de señalización celular controlado por las proteínas G transducinas ya que son capaces de unirse a los complejos formados por las proteínas G_{β} y G_{γ} transducinas (dímeros $G_{\beta\gamma}$) e inhibir así su unión a la proteína G_{α} , que posteriormente se encargarían de activar a los efectores de señales. Sin embargo, y en lo que concierne a las PhLPs, estudios recientes apuntan que este grupo de proteínas podrían actuar como cochaperonas de CCT en la asistencia del plegamiento de numerosas proteínas (Willardson y Howlett, 2007). La familia de proteínas fosducinas se pueden dividir en tres subgrupos (Blaauw y cols., 2003). El subgrupo I incluye a los dos miembros que fueron los primeros en descubrirse, Pdc (del inglés *phosducin*) y PHLP1. Pdc no interacciona con CCT y regula la transducción de señales en células retinales uniéndose a los dímeros $G_{\beta\gamma}$ transducina para prevenir su reasociación con G_{α} (McLaughlin y cols., 2002; Martín-Benito y cols., 2004). PHLP1 interacciona fuertemente con CCT y su unión ha sido caracterizada por criomicroscopía electrónica (Martín-Benito y cols., 2004). Varios estudios apuntan a que PHLP1 actúa como cochaperona de CCT en el plegamiento del dímero $G_{\beta\gamma}$ ya que PHLP1 sería un componente esencial en el ensamblaje de $G_{\beta\gamma}$ nativa al mediar en la liberación de G_{β} nativa desde CCT para

interaccionar con G_γ y estabilizar el complejo $G_{\beta\gamma}$ (Lukov y cols., 2005, 2006; Humrich y cols., 2005). PHLP2 y PHLP3 no participan activamente en la regulación de las proteínas G transducinas pero han sido caracterizadas como cochaperonas de CCT en el plegamiento de proteínas esenciales en el ciclo celular como actina y tubulina (Stirling y cols., 2006; Stirling y cols., 2007).

1.9. Chaperonas de la familia Hsp70.

Las proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70) son una familia de chaperonas moleculares que están involucradas en el plegamiento de numerosas proteínas (Rothman y Smith, 1986; Glick y cols. 1995; Bukau y Horwich, 1998; Young y cols., 2003) y en el control de varias funciones celulares, gracias a su interacción con varias cochaperonas (Cyr y cols., 1994). Las chaperonas Hsp70 son proteínas monoméricas que están compuestas por dos dominios funcionales: el dominio N-terminal o dominio de unión a nucleótido ($Hsc70_{NBD}$), altamente conservado entre sus representantes, que une e hidroliza ATP, y el dominio C-terminal o dominio de unión a sustrato ($Hsc70_{PBD}$), encargado de la unión a los péptidos desnaturalizados (figura 1.8). Mediante la interacción reversible con segmentos hidrófobos cortos de proteínas, las Hsp70s participan en multitud de funciones relacionadas con el plegamiento de cadenas polipeptídicas. Así, las proteínas Hsp70 intervienen en la adquisición de la estructura nativa en proteínas recién sintetizadas evitando su agregación, en el replegamiento de proteínas desnaturalizadas, en la renaturalización de agregados proteicos y colaboran en la degradación de proteínas desnaturalizadas (Höhfeld y cols., 2001; Mayer y Bukau, 2005; Bukau y cols., 2006).

La familia Hsp70 es muy amplia y está presente en todos los organismos excepto en algunas arqueas. En lo que se refiere a organismos eucariotas, pueden encontrarse más de una docena de diferentes Hsp70, localizadas en una amplia variedad de compartimentos celulares. Algunas de las mejor caracterizadas son la Hsc70 (Hsp 73), que es la Hsp70 citosólica que se produce de manera constitutiva, Hsp70 (Hsp 72), forma citosólica pero que se induce en situaciones de estrés, Bip (Grp 78) presente en el retículo endoplasmático, y mtHsp70 (o mito-Hsp70 o Grp75), la forma mitocondrial. En levaduras, se conocen 14 representantes (James y cols, 1997), los homólogos de Hsc70

y Bip son conocidos como Ssa1-4 y Kar2, respectivamente. En *E. coli*, la Hsp70 más importante y estudiada hasta la fecha es DnaK (Fink, 1999).

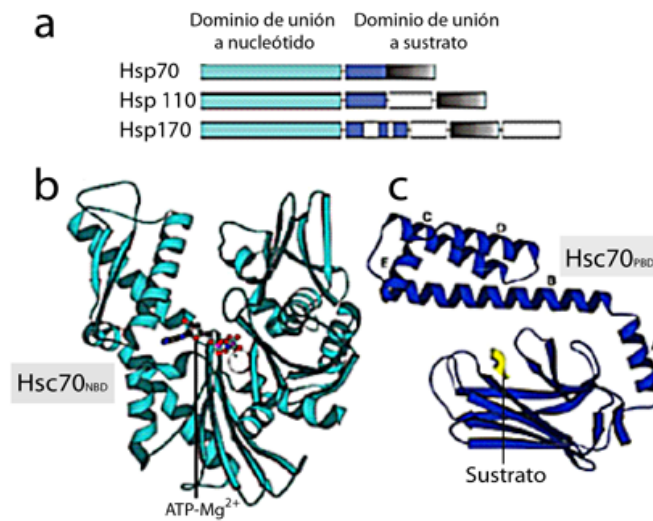


Figura 1.8: Estructura de Hsp70. (a) representación esquemática del dominio ATPasa (azul ciano) y el dominio de unión a sustrato de diferentes familias Hsp. El dominio ATPasa está muy conservado en Hsp70, Hsp110 y Hsp170. (b) Representación del dominio Hsc70_{NBD} en estructura secundaria (número de acceso pdb:3HSC). (c) Estructura del dominio Hsc70_{PBD} en complejo con un péptido-sustrato (número de acceso pdb:1DG4).

1.10. Ciclo funcional de las proteínas Hsp70.

Todas las chaperonas Hsp70 son sistemas alostéricos en los que la unión de nucleótidos regula la accesibilidad del sustrato peptídico a Hsp70_{SBD}, y a su vez, la unión del péptido estimula la actividad ATPasa característica de Hsp70_{NBD}.

El ciclo funcional de las proteínas Hsp70 comienza con la unión del ATP en Hsp70_{NBD} y la posterior hidrólisis de este nucleótido se coordina con la interacción de sustratos polipeptídicos en el dominio Hsp70_{SBD}, a través de un mecanismo que implica cambios conformacionales en Hsp70. El sitio de unión a sustrato se abre periódicamente, independientemente del nucleótido unido. Sin embargo, los nucleótidos ADP o ATP modifican de forma diferente la frecuencia de apertura y cierre de la cavidad de unión a sustrato. En la conformación Hsp70-ATP, la velocidad de apertura es mayor que la velocidad de cierre, mientras que en la conformación Hsp70-ADP, la velocidad de apertura es menor que la de cierre (Schmid y cols., 1994). Puesto que en el estado ADP,

Hsp70 es capaz de unir sustratos y los datos estructurales descartan una difusión lateral del sustrato en el sitio de unión a péptido, es necesario que Hsc70_{PBD} se abra ocasionalmente para permitir, incluso en el estado Hsp70-ADP, la asociación a sustratos con el péptido. En el estado Hsp70-ADP, la velocidad de asociación a sustratos es significativamente mayor que la velocidad de unión controlada meramente por difusión (Fung y cols., 1996; Schmid y cols.1994). La consecuencia más importante de esta diferencia entre los estados Hsp70-ATP y Hsp70-ADP es la drástica disminución de afinidad de Hsp70 por el sustrato peptídico en el estado ATP frente al estado ADP (figura 1.9).

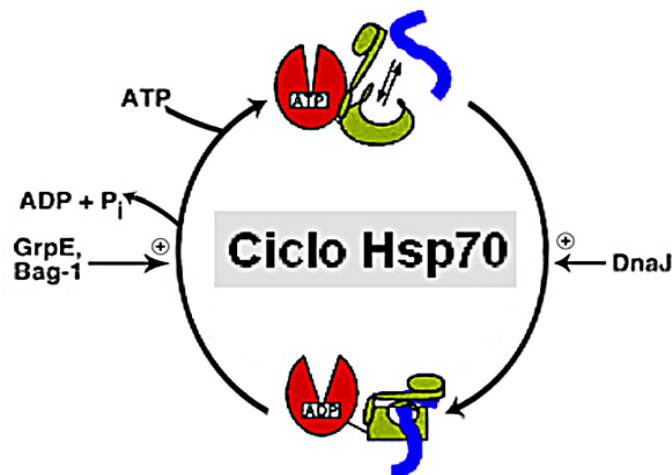


Figura 1.9: Ciclo ATPasa de las Chaperonas Hsp70. En el estado ATP-Hsp70, la unión del ATP induce la unión y liberación rápida del sustrato. En el estado ADP-Hsp70, la afinidad por los sustratos es muy alta pero las relaciones de asociación y disociación son bajas. La transición entre las conformaciones de baja y alta afinidad por el sustrato está condicionada por la hidrólisis de ATP, lo que genera una interacción simultánea con el sustrato y cochaperonas de la familia DnaJ. El intercambio ADP/ATP que controla la vida media del complejo sustrato/Hsp70 está regulado por factores de intercambio de nucleótidos, GrpE en procariotas y proteínas de la familia Bag en eucariotas.

Una vez que una chaperona Hsp70 ha unido ATP es capaz de interactuar con el sustrato pero la hidrólisis de ATP es extremadamente lenta y se ve incrementada en torno a 3-4 veces cuando la proteína une el sustrato peptídico. Aún así, esta velocidad de hidrólisis no sería lo suficientemente rápida para que Hsp70 pudiese realizar su actividad chaperona. Es por ello que en este momento del ciclo funcional se requiere la participación de las cochaperonas Hsp40 (DnaJ en procariotas) que ejerce una actividad

esencial en este proceso estimulando simultáneamente la actividad ATPasa de Hsp70 en torno a 1000 veces y el anclaje del sustrato en el sitio de unión a péptido de Hsp70 (Karzai y cols., 1996; Laufen y cols., 1999).

Además de la estimulación de la capacidad hidrolítica de Hsp70 por parte de Hsp40, se ha propuesto que las cochaperonas Hsp40 pueden transferir sustratos a Hsp70. De esta manera, en un primer paso el sustrato se uniría al dominio de unión a sustrato de Hsp70, y por medio de un mecanismo desconocido el complejo Hsp40-sustrato interaccionaría con Hsp70 en su estado Hsp70-ATP (Karzai y cols., 1996; Laufen y cols., 1999). Tras la hidrólisis de ATP, Hsp70 sufre un cambio conformacional de tal manera que la frecuencia de apertura del sitio de unión a sustrato mucho menor que en la conformación Hsp70-ATP, y por lo tanto el sustrato se encuentra fuertemente unido a la chaperona. La disociación del ADP de la hendidura de unión a nucleótido es lenta y por esta razón intervienen unas proteínas denominadas factores de intercambio de nucleótido (del inglés *Nucleotide Exchange Factors*; NEFs) que inducen la liberación de ADP de Hsp70. En los organismos eucariotas se encuentran las proteínas de la familia BAG (Sondermann y cols., 2001), mientras que en los procariotas se encuentran proteínas como GrpE, que puede llegar a aumentar 5000 veces la liberación del ADP resultante de la hidrólisis del ATP por DnaK (Packschies y cols., 1997). La unión posterior del ATP a Hsp70 permite la liberación del sustrato que tendrá la posibilidad de adquirir la conformación nativa, de volver a unirse al sistema para comenzar una nueva ronda de interacción con la chaperona, o de unirse a otros sistemas de chaperonas que se encuentren en la célula.

1.11. Estructura y composición de las chaperonas Hsp70

Como hemos comentado anteriormente, las Hsp70 están compuestas por dos dominios estructurales (Figura 1.8). El dominio N-terminal (Hsp70_{NBD}) tiene una masa molecular aproximada a 44 kDa, es estructuralmente similar a la actina y hexoquinasa, y posee una cavidad profunda donde se une el nucleótido (Figura 1.10e). El dominio C-terminal o Hsp70_{PBD}, de unos 30 kDa, tiene dos dominios; uno de unión a sustratos, compuesto a su vez por un subdominio β -sandwich y otro α -helicoidal, y un dominio final de unos 10 kDa, que es necesario para la interacción con otras chaperonas (Wang y cols., 1993; Zhu y cols., 1996; Chou y cols., 2003). El sustrato se une a Hsp70 en una conformación

extendida o abierta a través de un canal formado por una serie de láminas- β definidas desde el subdominio β -sándwich. El subdominio en forma de bisagra formado por α -hélices estabiliza el complejo formado con el sustrato pero sin contactar directamente con el péptido. Únicamente 5 residuos de la proteína sustrato contactan con Hsp70 (Figura 1.10b), explicando así la especificidad por los péptidos cortos y de carácter hidrofóbico, con una fuerte preferencia por residuos como la leucina en regiones centrales y por residuos cargados negativamente en los extremos (Blond-Elguindi y cols., 1993). Los últimos 40-50 aminoácidos del C-terminal del dominio de unión a sustrato no han sido resueltos hasta la fecha, posiblemente debido a su alta flexibilidad y, al menos en eucariotas, es una zona muy conservada que contiene repeticiones GGXP y un motivo EEDV (Chou y cols., 2003).

A pesar de que se conoce desde hace tiempo la estructura atómica de los dos dominios por separado tanto por técnicas de NMR y de rayos-X en ausencia y presencia de ligandos (Flaherty y cols., 1990, 1994; Zhu y cols., 1996; Sriam y cols., 1997; Wang y cols., 1998; Morshauer y cols., 1999), sólo muy recientemente se ha podido determinar la estructura atómica de una Hsp70 (Jiang y cols., 2005 (Figura 1.10); Revington y cols., 2005; Swain y cols., 2007), lo que ha permitido alcanzar un mayor conocimiento de la base estructural del mecanismo alostérico que permite a las proteínas Hsp70 coordinar la unión de polipéptidos en un ciclo regulado por la unión e hidrólisis de ATP.

Parece claro que en la regulación de dicho mecanismo juega un papel muy importante el pequeño lazo hidrofóbico y altamente conservado en todos los miembros de Hsp70 (VQDLLLDV en la Hsc70 bovina) que comunica los dos dominios funcionales de Hsp70 (Karlin y Brocchieri, 1998; Laufen y cols., 1999; Mayer y cols., 1999; Han y Christen, 2001; Vogel y cols., 2006). La estructura atómica de Hsc70 (a la que le faltan los últimos 106 aminoácidos del C-terminal; Hsc70 Δ C) y el análisis de varios mutantes de la región que comunica los dos dominios de Hsp70, indica que el mecanismo de comunicación alostérica entre el dominio ATPasa y el dominio de unión a sustrato tiene lugar en la zona de contacto entre ambos dominios y el lazo hidrofóbico que los une (Figura 1.10a, 1.10b) (Jiang y cols. 2005). Observaciones previas de diferentes conformaciones del dominio de unión a péptido unido al lazo hidrofóbico (Zhu y cols.,

1996; Wang y cols., 1998) y la eliminación de la hidrólisis de ATP por la proteólisis del lazo hidrofóbico (Buchberger y cols., 1995; Wei y cols., 1995) coinciden con ese movimiento del lazo de unión desde una zona más expuesta a otra más protegida cuando el ATP está unido a Hsp70.

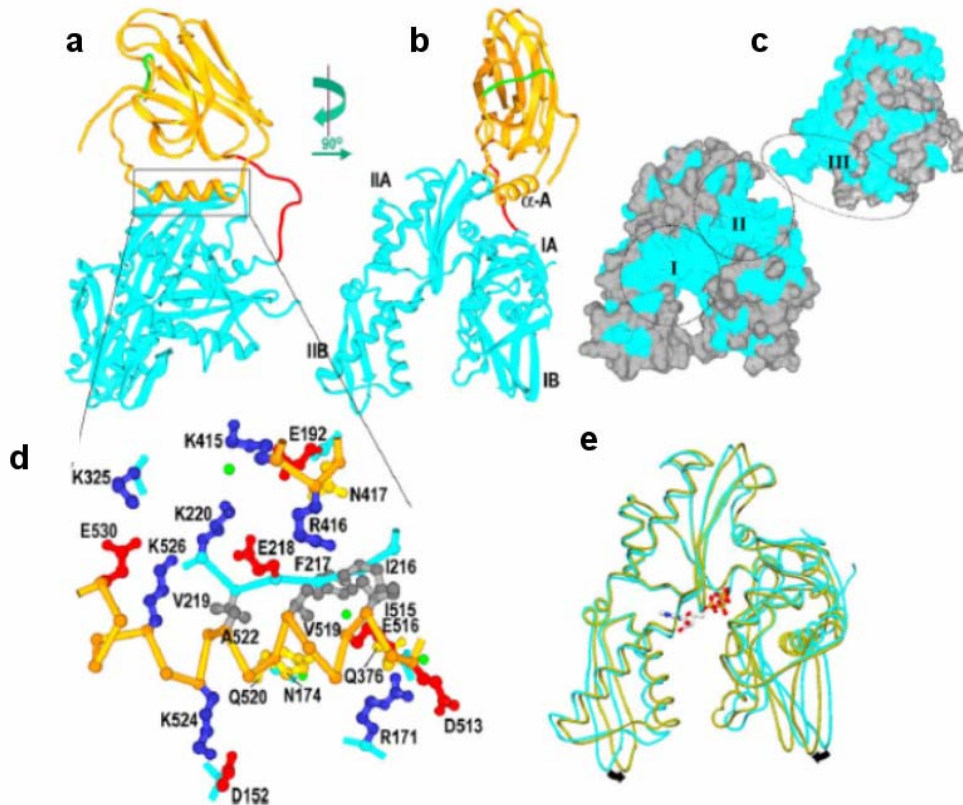


Figura 1.10: Estructura atómica de Hsc70 a la que le faltan los últimos 106 aminoácidos del C-terminal (Hsc70 Δ C). (a) Representación de Δ Hsc70 con el Δ Hsc70_{NBD} (residuos 1-383) coloreado en azul, Δ Hsc70_{PBD} (residuos 395-554) en amarillo, el lazo de unión (residuos 384-394) en rojo y el sitio de unión a sustratos (residuos 539-544) en verde. (b) La misma representación que en el apartado anterior pero con la rotación que se indica en la figura. (c) Representación de los dos dominios funcionales de Hsc70 donde se destacan algunos de los residuos conservados entre Hsc70 y su homólogo procariota, DnaK (coloreados en azul). La zona "I" corresponde a los residuos conservados en el sitio de unión a ATP del NBD, la zona "II" corresponde a la superficie de NBD en contacto con SBD y la zona "III" corresponde a los residuos del lazo de unión entre NBD y SBD. (d) Detalle de la zona de a) destacada con el recuadro. Corresponde a las interacciones que tienen lugar entre el NBD y SBD de Hsc70. (e) Superposición del NBD de Hsc70 unido (azul) o no (verde) a ATP. La unión de ATP puede inducir el cierre de la cavidad de NBD según como indican las flechas. Adaptado de Jiang y cols., 2005.

A diferencia de lo expuesto anteriormente, estudios en los que se comparan actividades ATPasa de DnaK en función de la concentración de sustrato y dependientes del pH del medio, muestran que el lazo hidrofóbico es el elemento único y necesario para el control alostérico de Hsc70_{PBD} por parte del Hsc70_{NBD} (Laufen y cols., 1999; Sehorn y cols., 2002; Swain y cols., 2007). De esta manera, cuando se une ATP a Hsp70, el lazo

hidrofóbico induce al cierre de la cavidad formada por los lóbulos IA y IIA del dominio ATPasa (Flaherty y cols., 1994) y actuaría como un interruptor capaz de estimular la actividad ATPasa. Este hecho se puede apoyar en estudios de resonancia magnética nuclear que indican que la región VLLL del lazo hidrofóbico de DnaK interacciona con la hendidura hidrofóbica que forman el subdominio IA y IIA del dominio ATPasa (Swain y cols., 2007). Este estudio, con el análisis de la estructura atómica de los dos dominios funcionales de DnaK unidos muestra que dichos dominios únicamente interaccionan cuando ATP está unido a Hsc70_{NBD}. En un estado Hsp70-ADP, al igual que un estado libre de nucleótido (Swain y cols., 2006), los dos dominios unidos por el pequeño lazo hidrofóbico trabajarían independientemente sin un contacto evidente entre ambos. En un estado Hsp70-ATP, se produciría la unión de Hsc70_{NBD} con Hsc70_{PBD} gracias a los cambios conformacionales que se producirían en ambos dominios. Es decir, aún en presencia de sustrato, únicamente se producirían cambios conformacionales que provocarían la unión de los dos dominios funcionales en presencia de ATP (Figura 1.11).

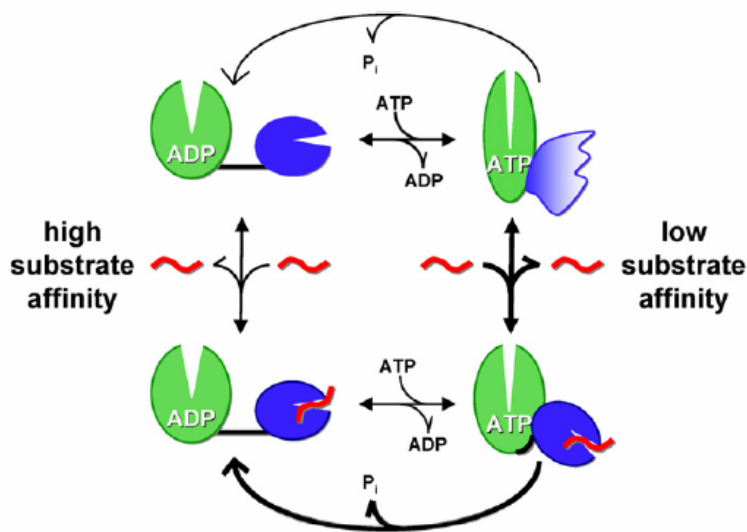


Figura 1.11: Modelo de comunicación entre los dominios funcionales de las proteína Hsp70 (Swain y cols., 2007). En el estado Hsp70-ADP, los dos dominios serían independientes y estarían comunicados por un pequeño lazo hidrofóbico. Cuando se une el ATP, se producirían grandes cambios conformacionales en ambos dominios y que provocaría la unión de los mismos. En este momento también se producirían los cambios conformacionales necesarios para la unión del sustrato. Cuando se une el sustrato (en rojo), el contacto entre Hsc70_{NBD} y Hsc70_{PBD} no sería tan íntimo y el lazo de unión únicamente estaría en contacto con Hsc70_{NBD} estimulando la hidrólisis de ATP.

1.12. Cofactores y cochaperonas de Hsp70

Numerosas proteínas de señalización celular requieren la acción coordinada de Hsp70 y Hsp90 para su correcto plegamiento y regulación conformacional. Dentro de estos sustratos encontramos receptores nucleares de hormonas esteroideas y quinasas protoncogénicas como por ejemplo Raf y Src (Caplan, 1999). Hsp90 recibe sus sustratos desde Hsp70 en una reacción dependiente de la función de Hop (del inglés *Hsp70/Hsp90 organizing protein*), también llamada p60 o Sti1p, proteína que adapta y proporciona un lugar específico de unión para ambas chaperonas (Figura 1.12) (Jonson y cols., 1998). Hop está compuesta casi exclusivamente por dominios TPR (del inglés *tetratricopeptide repeat*) que se componen de tres o más motivos TPR, los cuales poseen repeticiones de 34 aminoácidos. Hop contiene 9 motivos TPR en su secuencia, formando dos dominios TPR. El dominio N-terminal TPR, TPR1, posee 3 motivos TPR y es responsable de la interacción con el C-terminal de Hsp70; mientras que el dominio C-terminal de TPR, TPR2, con seis motivos TPR media la interacción de Hop con Hsp90. Tanto Hsp90 como Hsp70 poseen motivos EEVD que junto a contactos hidrófobos externos a estos motivos son elementos fundamentales en la unión con los dominios TPR de Hop (Scheufler y cols., 2000).

Otra cochaperona de Hsp70 es HIP (del inglés *Hsp70 interacting protein*), una proteína de 43 kDa que regula la actividad de Hsp70 por unión a su dominio ATPasa, estabilizando la forma ADP-Hsp70, que tiene una alta afinidad por la unión a sustrato (Höhfeld y cols., 1995). HIP participa en la maduración del receptor de la progesterona y con su acción evitar la agregación de la rodanasa al colaborar con Hsp70 y Hsp90 (Velten y cols., 2000, 2002). No se conoce la estructura a alta resolución de HIP pero se piensa que existe una región central con dominios TPR implicada en la unión a Hsp70.

El control de calidad de proteínas es un proceso que tiene lugar fundamentalmente en el citoplasma y el retículo endoplasmático, y es esencial, ya que previene la acumulación de péptidos desnaturalizados con superficies hidrófobas expuestas que pueden ocasionar situaciones de agregación de proteínas tóxicas o síntesis de proteínas aberrantes implicadas en enfermedades como el Alzheimer, Parkinson o disfunciones relacionadas con los priones (Ma y Hendershot, 2001). Hsp70 junto Hsp90 son las chaperonas que juegan un papel fundamental en el control de calidad de proteínas que tiene lugar en el

citoplasma celular. En algunos casos, Hsp70 y Hsp90 cooperan en el plegamiento del mismo sustrato que es mono o diubiquitinado por un complejo que contiene las enzimas E2 y E3 que tienen un dominio HECT (del inglés *homologous to E6-associated protein C-terminus*). La poliubiquitinación de los sustratos sólo se produce en presencia de un factor adicional llamado E4 y está asociada al transporte y degradación en el proteosoma (Koepl y cols.,1999). Existen otras vías de poliubiquitinación donde participan proteínas con dominios RING E3 o dominios U-box, como es el caso de CHIP, y que al igual que en el caso anterior, Hsp70 y Hsp 90 juegan un papel fundamental en la unión del sustrato y en su posterior transporte al proteosoma para su degradación (Figura 1.12) (Cyr y cols. 2002).

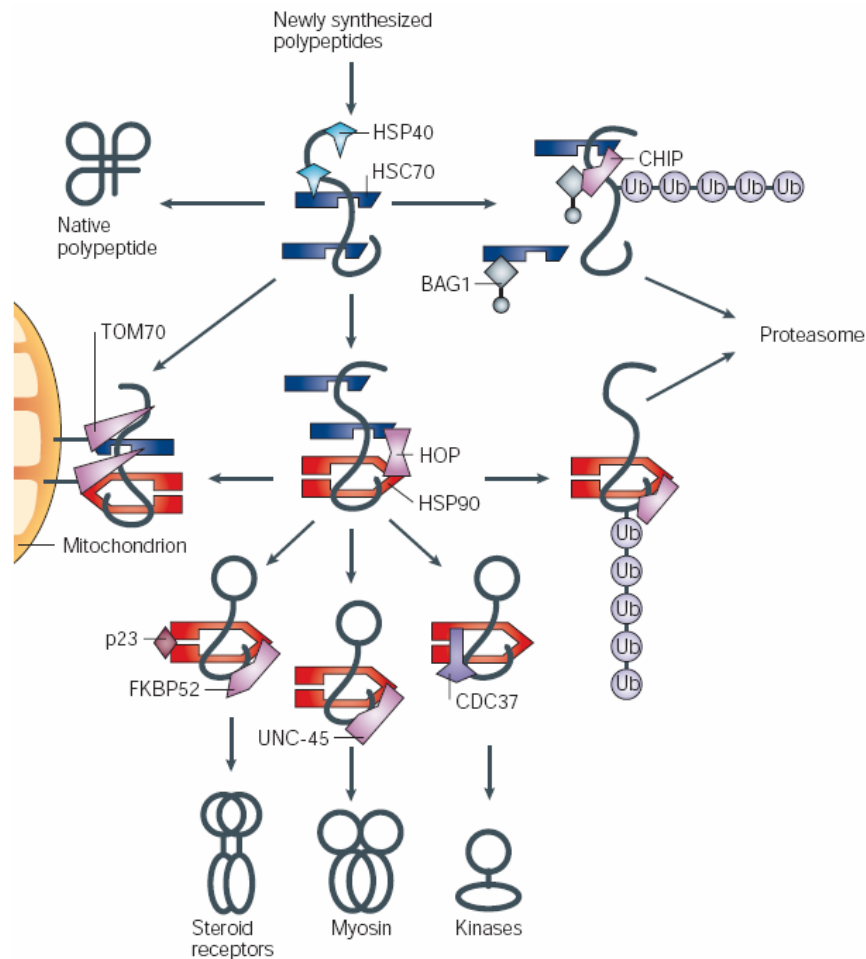


Figura 1.12: Mecanismo de plegamiento regulado por el sistema Hsp70-Hsp90. Las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas interaccionarían con Hsp70 que trabaja conjuntamente con chaperonas del tipo Hsp40. Algunos de estos péptidos plegarían únicamente con la asistencia de Hsp70, mientras que otros pasarían a Hsp90. Hop se encargaría de organizar la transferencia receptores esteroideos desde Hsp70 a Hsp90. Otras proteínas como FKBP52, UNC-45 y CDC37 trabajarían conjuntamente con Hsp90 en el plegamiento de receptores esteroideos, miosina y algunas quinasas. La proteína CHIP interaccionaría con Hsp70 o Hsp90 con el fin de poliubiquitinar a diferentes sustratos polipeptídicos que serían posteriormente degradados en el proteosoma. En este último proceso podría intervenir también BAG-1. Adatado de Young y cols., 2004.

Como hemos comentado anteriormente, la unión del sustrato a Hsp70 es capaz de estimular la hidrólisis de ATP pero no es suficiente para mantener el ciclo funcional, y por ello es necesaria la actividad de las proteínas pertenecientes a la familia de las Hsp40 o proteínas J (Hartl, 1996). Los miembros de la familia de proteínas Hsp40 se han clasificado en tres grupos dependiendo de la composición de sus dominios. El grupo I posee los cuatro dominios característicos del prototipo de proteína Hsp40. Estos dominios son un dominio J en la región N-terminal, una región rica en glicinas y fenilalaninas, un dominio rico en cisternas, que une dos átomos de zinc y un dominio C-terminal. Las proteínas J de la clase II carecen del dominio de unión a zinc y la clase III está caracterizada por poseer además de los dominios mencionados, otros diferentes como hélices transmembrana (Cheetham y cols., 1998).

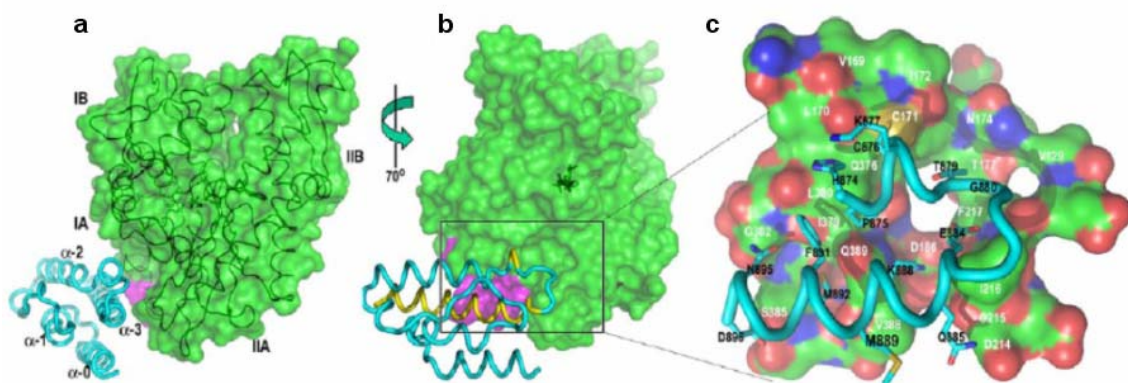


Figura 1.13: (Jiang y cols., 2007): (a) Estructura del complejo dominioJ:Hsc70NBD. El dominioJ está coloreado en azul y representado en forma de cinta; el Hsc70NBD de color verde destacando los residuos 383-390 que interactúan con el dominioJ en color magenta. (b) la misma representación que en a) pero girada como indica la imagen (c) Detalle de la zona de b) indicada en el recuadro. Se muestran los residuos más representativos implicados en la interacción del dominioJ con Hsc70NBD.

Hsp40 actúa regulando el ciclo de hidrólisis de ATP de Hsp70 y como chaperona molecular uniendo proteínas en estado no nativo al sitio de unión de Hsp70 (van den Berg y cols. 1999). Para regular la actividad ATPasa de Hsp70, las proteínas Hsp40 utilizan una región muy conservada en todos sus miembros que se llama dominio J (Martin y Hartl, 1997). El dominio J posee una longitud de unos 70 aminoácidos y contiene un tripéptido HPD muy conservado en todos los representantes que forman parte de esta familia de proteínas. Hsp40 se une al dominio ATPasa de Hsp70 gracias a

este dominio HPD y estimula la hidrólisis de ATP (Figura 1.13) (Jiang y cols., 2007). La energía derivada de la hidrólisis del ATP genera un cambio conformacional en Hsp70, necesario para propulsar el cierre de la estructura en forma de tapa del dominio de unión a sustrato y de esta manera obtener el complejo sustrato-Hsp70 en una forma estabilizada (Teter y cols., 1999; Jiang y cols., 2007).

La liberación del ADP y Pi, originados tras la hidrólisis de ATP, permite la rápida unión del ATP y la consiguiente liberación del sustrato. Por lo tanto, el intercambio de nucleótido es un paso crucial en el ciclo funcional de las Hsp70. La velocidad de disociación del ADP es variable en los diferentes miembros de esta familia y contribuye probablemente a la diversificación funcional de los sistemas de chaperonas Hsp70. También es diferente el requerimiento de cofactores que aceleren este proceso. En DnaK, la liberación de ADP es muy lenta y es necesaria la acción del intercambiador de nucleótido, GrpE (Shomura y cols., 2005). En la proteína homóloga Hsc70, la velocidad de disociación es intermedia y a pesar de que esta proteína es funcional en ausencia de factores intercambiadores de nucleótido, puede interactuar con BAG para acelerar este proceso. La familia de proteínas BAG (del inglés *Bcl-2 associated athanogene*) son proteínas que al menos poseen un dominio BAG, el cual interactúa con el extremo del subdominio IIB de Hsc70 acelerando el proceso de intercambio de nucleótido (Sondermann y cols., 2001). Los dominios BAG, de en torno a 110 aminoácidos, son regiones muy conservadas del C-terminal y consisten en tres α -hélices antiparalelas. La segunda y tercera α -hélices de BAG interactúan con el dominio ATPasa de Hsp70 haciendo incompatible la unión del nucleótido al dominio ATPasa (Sondermann y cols., 2001).

Las proteínas de la familia BAG participan en una amplia variedad de procesos celulares como proliferación, migración y apoptosis. Dicha actividad antiapoptótica de algunas proteínas de la familia BAG parece ser dependiente de su interacción con Hsc70/Hsp70 y la unión a la proteína Bcl-2 (Takayama y cols., 1997, 2001; Doong y cols., 2002).

1.11. Proceso de colaboración de las chaperonas Hsp60 y Hsp70 en el plegamiento de proteínas.

Con todo lo comentado anteriormente parece claro que la maquinaria que actúa en la asistencia del plegamiento de péptidos recién sintetizados en el citoplasma eucariota es llevada a cabo en un alto porcentaje por la acción de dos tipos principales de chaperonas (Hsp70 y Hsp60) en un proceso encadenado estructural y funcionalmente. Esto refleja un principio básico del plegamiento de proteínas celulares: la cooperación ordenada de diferentes clases de chaperonas moleculares en el plegamiento de proteínas. Este mecanismo de actuación de la maquinaria de chaperonas citosólicas, centrado en las familias Hsp60 y Hsp70, se ha generalizado tanto para procariotas como eucariotas. A pesar de esto, y comparándolo con lo que ocurre en bacterias, el rango de proteínas que necesitan la asistencia de chaperonas en el citosol eucariota conlleva un proceso más complejo y precisa de requerimientos mucho más diversos que la maquinaria heredada de las bacterias (Young y cols., 2004). En este contexto, son varios los trabajos que ponen de manifiesto la existencia de un proceso de colaboración entre las dos chaperonas más representativas del citoplasma eucariota (Lewis y cols., 1992; Frydman y cols., 1994; Hynes y cols., 1996; Siegers y cols., 2003) pero las características del mecanismo de colaboración entre Hsp70 y CCT son bastante desconocidas. Se ha descrito un grupo de proteínas con repeticiones WD40 del citosol de levaduras que interaccionarían transitoriamente con CCT y Ssb1/2p (Hsp70 de levaduras) para alcanzar su conformación nativa. Este grupo de proteínas incluiría a la subunidad de la β -transducina Ste4, la fosfatasa reguladora Cdc55, el receptor peroxisomal Pex7 y los activadores del complejo promotor de la anafase, Cdh1 y Cdc20 (Siegers y cols., 2003; Camasses y cols., 2003, Young y cols., 2004). En contraste, el plegamiento de actina y tubulina recién sintetizadas es independiente de Hsp70 y requiere de la cochaperona PFD para una transferencia eficiente a CCT. Este hecho parece indicar que aunque CCT y Hsp70 poseen un papel primordial en el plegamiento de proteínas en el citoplasma celular su posible interacción parece estar restringida a un determinado grupo de proteínas sustrato (Figura 1.14).

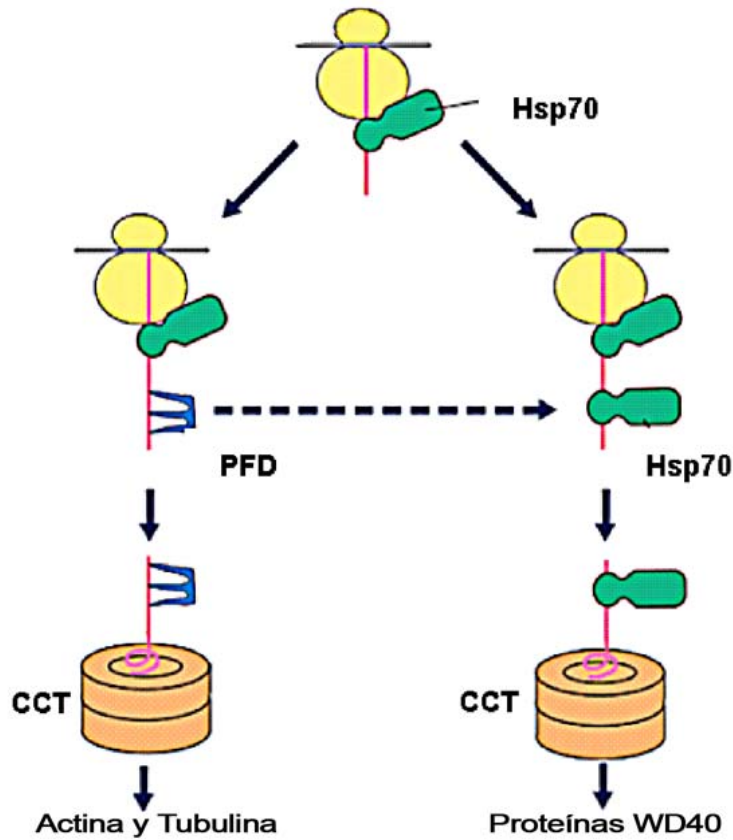
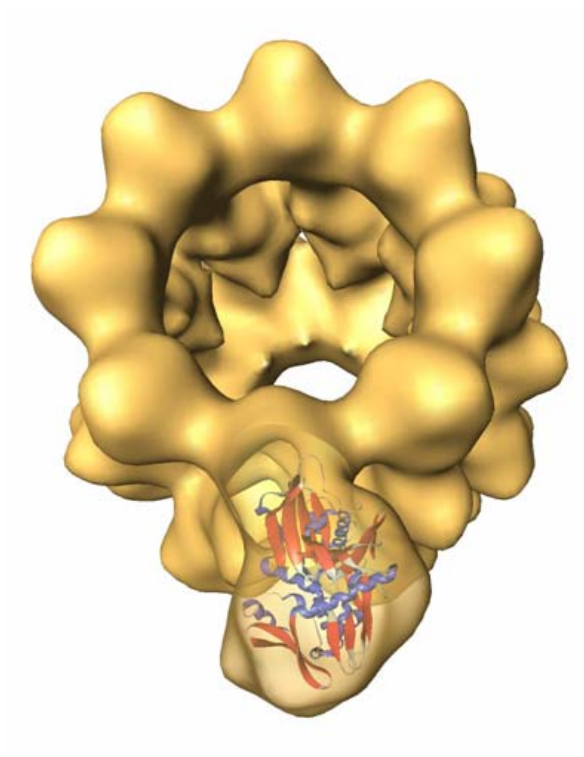


Figura 1.14: Modelo de plegamiento para los diferentes sustratos de CCT (Siegiers y cols, 2003). El proceso de plegamiento para actina y tubulina (izquierda) es muy diferente al seguido por proteínas con dominios WD40 (derecha). Por un lado, PFD es requerida para el plegamiento de actina/tubulina y por otro, Hsp70 es necesaria para el correcto plegamiento de proteínas WD40. El último paso en ambas rutas de plegamiento sería la presentación del sustrato a CCT para finalizar dicho ciclo.

2. Objetivos

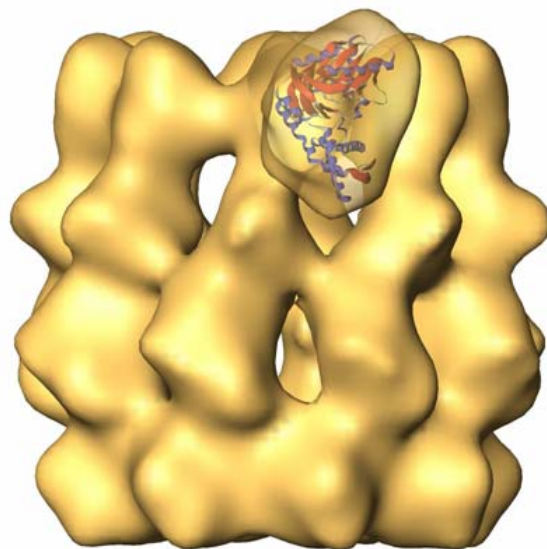


Las investigaciones realizadas en los últimos años han permitido avanzar en el conocimiento del mecanismo que emplean para ejercer su función las chaperonas moleculares de las familias Hsp60 y Hsp70. Sin embargo, queda por responder cómo se coordinan funcionalmente dichos sistemas con el fin de asistir el correcto plegamiento de determinadas proteínas.

Los objetivos de esta Tesis doctoral se centran en estudiar la interacción que existe entre las chaperonas citoplasmáticas CCT y Hsc70 y, son:

- 1.** Determinar si existe una interacción estable entre los miembros procariota y eucariota de las chaperonas Hsp60 y Hsp70.
- 2.** De existir, caracterizar estructural y funcionalmente tal interacción.

3. Materiales y métodos



3.1. Purificación de CCT de testículos de toro.

El protocolo que aquí se describe es una modificación de varios anteriormente publicados (Gao y cols, 1992; Norcum y cols., 1996; Ferreira y Frydman, 2000; Martín-Benito y cols., 2002). Para la purificación de la chaperonina se limpiaron y cortaron aproximadamente 80 gramos de testículo de toro y posteriormente se homogeneizaron en una trituradora Ultra Turrax (Janke&Kunkel; Ika Labortechnik) usando el adaptador 25G. Por cada 10 gramos de tejido se añadieron 10 ml de tampón de homogeneización (tampón H; 20 mM Tris-HCl, pH 7,2, 50 mM KCl, 5 mM Mg₂Ac, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 pastillas de cocktail de inhibidores (Roche)). Posteriormente se rompieron las células mediante homogeneización por fricción utilizando para ello un homogeneizador de vidrio-teflón. Las mitocondrias y lisosomas se eliminaron mediante una centrifugación suave durante 30 minutos a 4 °C y 10000 r.p.m. en un rotor SS34 (Sorvall). El sobrenadante se centrifugó durante 1 hora a 4 °C y 24000 r.p.m. en un rotor 50.2Ti (Beckman). Los ribosomas y componentes subcelulares van al precipitado, y los fosfolípidos y lipoproteínas, que quedaron en la superficie como una capa amarillenta, se eliminaron por filtración.

El sobrenadante obtenido corresponde a la fracción citosólica, y sobre ella se realizó una precipitación fraccionada de sulfato amónico en dos pasos, uno hasta el 30% de saturación y otro hasta el 50% de saturación. En los dos pasos de precipitación la solución se centrifugó en un rotor SS34 (Sorvall) a 10000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C. El precipitado de la última centrifugación que contenía CCT, se resuspendió en tampón A (50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 150 mM NaCl, 5 mM Mg₂Ac, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF y 10% de glicerol) y se dializó frente al mismo tampón. La solución dializada se cargó en un gradiente continuo de sacarosa del 10% al 40% (p/v) a partir de 13 disoluciones de distinto porcentaje de sacarosa por congelación y descongelación del mismo (Quaite-Randall y Joachimiak, 1999). Se cargaron 1,5 ml de muestra por tubo de gradiente y se centrifugaron durante 17 horas a 27500 r.p.m. a 4 °C en un rotor SW28 (Beckman). Tras la centrifugación, se deshicieron los gradientes, se tomaron fracciones con ayuda de una bomba peristáltica P1 de Amersham Biosciences y se juntaron aquéllas que por electroforesis desnaturalizante de acrilamida al 10 % (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) se detectó que contenían CCT.

Posteriormente, las fracciones que contenían CCT se juntaron y se dializaron frente a tampón A con 150 mM NaCl y se pasaron por una columna de cromatografía de afinidad HiTrap Heparin HP (Amersham Biosciences) de 5ml, acoplada a un sistema de FPLC (AKTA, Amersham Biosciences) y equilibrada con el mismo tampón. Antes de añadir la muestra a la columna se filtró por unos filtros Millipore de PVDF de 0,45 μm . Tanto la carga como la elución se realizaron a un flujo de 3ml/min y se recogieron fracciones de 1,5 ml. La muestra cargada se eluyó mediante un gradiente continuo de tampón A desde 150 mM NaCl hasta 1 M NaCl. CCT eluyó entre 450 mM-500 mM NaCl. Las fracciones que por SDS-PAGE se comprobaron que contenían CCT, a este nivel con una pureza del 85 %, se concentraron con una unidad de filtración AMICON y se llevaron hasta un volumen final de 1 ml.

El último paso de purificación consistió en una cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex200 de 25 ml (Amersham Biosciences) acoplada en un sistema AKTA-PRIME (Amersham Biosciences) y equilibrada frente a tampón A con 450 mM NaCl. Antes de añadir la muestra a la columna se volvió a filtrar con filtros Millipore de PVDF de 0,45 μm . El flujo que se impuso al sistema se realizó a 0,2 ml/min, se recogieron fracciones de 0,5 ml. Las fracciones que por SDS-PAGE poseían CCT con una pureza superior al 95% se concentraron nuevamente con una unidad de filtración AMICON y se midió la concentración de proteína mediante el método del ácido bicícnico (BCA) hasta un volumen final en el cual la concentración de CCT fue aproximadamente de 1mg/ml. Finalmente se realizaron alícuotas de 100 μl , se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C.

3.2. Purificación de Hsc70 ΔC

Como se ha comentado anteriormente, Hsc70 ΔC es un mutante de Hsc70 en el que se han eliminado los últimos 106 aminoácidos del C-terminal. La purificación de Hsc70 ΔC se realizó siguiendo un procedimiento descrito anteriormente (Jiang y cols., 2005) pero con diversas modificaciones. La crecida del cultivo de *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS se realizó a 37 °C en medio LB con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hasta la fase exponencial de crecimiento ($A_{600\text{nm}}=0,6$), momento en el que se indujo la expresión de la proteína ΔHsc70 mediante una concentración final de IPTG de 0,4 mM durante 2

horas a 37 °C. Tras la inducción, 15 gramos de células obtenidas tras centrifugación (8000 r.p.m., 20 min, 4 °C, en una centrífuga Sorvall con un rotor GSA) se resuspendieron en 40 ml de tampón B (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 10%(v/v) glicerol y 1 mM PMSF) y se procedió a la ruptura celular con una incubación del extracto celular con lisozima (concentración final 0,7 mg/ml) durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, se añadieron 15 ml de NaCl 5 M y 0,8 ml de MgCl₂ 1 M y se trató con DNasa (concentración final 10 µg/ml) durante 20 minutos en hielo para después retirar los restos celulares mediante centrifugación (8000 r.p.m., 20 min, 4 °C, en una centrífuga Sorvall con un rotor SW34) y se dializó la muestra frente a tampón A. Los agregados originados durante la diálisis se eliminaron mediante centrifugación (10000 r.p.m., 10 min, 4 °C, en una centrífuga Sorvall con un rotor SW34) y se cargó el sobrenadante en una columna de afinidad HisTrap HP (Amersham Biosciences) de 1 ml equilibrada con tampón B. Seguidamente, se lavó con 5 volúmenes de columna del mismo tampón y se eluyó mediante un gradiente continuo de 30 volúmenes de columna en tampón A de 0 a 500 mM de imidazol. ΔHsc70 posee una cola de histidinas (6x) en el extremo N-terminal y eluyó a una concentración 150 mM de imidazol. Las fracciones recogidas al final del gradiente y que contenían ΔHsc70 se dializaron frente a tampón C (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl y 1 mM PMSF) y se concentraron utilizando una unidad de filtración AMICON.

El último paso de purificación consistió en una cromatografía de gel de filtración en una columna Superdex200 de 25 ml (Amersham Biosciences) acoplada en un sistema AKTA-PRIME (Amersham Biosciences) y equilibrada con tampón C. Antes de cargar la muestra a la columna se filtró con filtros Millipore de PVDF de 0,45 µm. El flujo que se impuso al sistema fue de 0,2 ml/min, y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Las fracciones que por SDS-PAGE poseían ΔHsc70 con una pureza superior al 95% se concentraron nuevamente con una unidad de filtración AMICON y se midió la concentración de proteína mediante el método del ácido bicínico (BCA) hasta un volumen final en el cual la concentración de Hsc70ΔC fue aproximadamente de 5mg/ml. Finalmente se realizaron alícuotas de 100 µl, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

La purificación de los mutantes Hsc70 Δ C₁₈₉₋₁₉₃ y Hsc70 Δ C₁₈₉₋₁₉₅ se llevó a cabo de forma similar a la purificación de la proteína silvestre pero con una modificación. Una vez obtenida la fracción citoplasmática tras la rotura celular, los sobrenadantes se cargaron en una columna de intercambio aniónico HiTrap mono-Q (Amersham Biosciences) de 5 ml equilibrada con tampón B, se lavó con 20 volúmenes de columna y se eluyó mediante un gradiente continuo de 50 volúmenes de columna de tampón B de 0 a 1 M de NaCl. Las fracciones recogidas al final del gradiente y que contenían los diferentes mutantes de Hsc70 Δ C se dializaron frente a tampón B. A partir de este momento, se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior.

3.3. Ensayo de interacción entre chaperoninas y chaperonas Hsp70/Hsp110.

Se pretendía comprobar bioquímicamente si miembros de las familias de chaperonas Hsp70 y Hsp110 (en este caso, SSE1 de *S. cerevisiae*) interaccionan con las chaperoninas CCT y su homólogo procariota, GroEL, mediante SNaDE (del inglés *semi-native diagonal electrophoresis*; Liou y Willison, 1997). Para ello, se incubaron la chaperonina con las chaperonas Hsp en una relación molar 1:10 en un termomixer durante unos 20 minutos a 30 °C y con agitación suave. Tras el período de incubación, se realizó una electroforesis nativa del 6% de acrilamida en tampón Tris-HCl pH 8,8, durante 3-4 horas a bajo voltaje (90-100 V). En este paso y debido a la muy diferente movilidad electroforética de las chaperoninas (con un peso molecular en torno a 800-1000 kDa) y de las Hsp (con pesos en torno a los 20-90 kDa) se pudo diferenciar perfectamente entre la proteína Hsp libre y la unida a las chaperoninas. La calle control de las chaperoninas se tiñó con Bio-Safe Coomassie de BIO-RAD (Coomassie G250), y en el transiluminador y con una cuchilla limpia se cortaron las bandas a la altura del control de las chaperoninas y se introdujeron en un tubo eppendorff. Las bandas se deshidrataron en una estufa y se rehidrataron con tampón de carga para electroforesis desnaturalizantes. Después de hervir las muestras, se introdujeron en un gel desnaturalizante y se corrieron a bajo voltaje (nunca más de 20 mA por gel). Los geles se tiñieron con azul de coomassie convencional.

En el caso de realizar una comprobación de la unión mediante anticuerpos se realiza una transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μ m (BIO-RAD) durante

toda la noche a 4 °C y 90 mA y en un sistema de transferencia húmeda (Hoefler TE Series Transpher Electrophoresis Unit) o en un sistema de transferencia semihúmeda (BIO-RAD, Trans-Blot). Para la transferencia se utilizó un tampón que contiene 20% metanol, 0,4 M Glicina y 50 mM Tris-Base. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó incluyendo la membrana en tampón WB (3% leche en polvo desnatada, 0,05% Tween20 en PBS 1X) durante 2 horas a temperatura ambiente, una hora a 37 °C ó toda la noche a 4° C, siempre con agitación suave. La incubación del primer anticuerpo se realizó durante 1 hora a 37 °C con agitación suave ó 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. El anticuerpo debe estar diluido en tampón WB, y la concentración final de éste varia dependiendo del tipo de anticuerpo (entre 1:1000 y 1:5000). Antes de incubar con el anticuerpo secundario se realizaron tres lavados de 10 minutos con tampón WB a temperatura ambiente y con agitación suave. El segundo anticuerpo, preparado normalmente con una dilución 1:2000-1:5000 en tampón WB, se incubó durante 30 min a 37 °C con agitación suave ó 1-2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, se realizaron tres lavados con tampón WB a temperatura ambiente y con agitación suave. El revelado se realizó con ECL-Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences). En los ensayos de interacción a CCT de los mutantes Δ Hsc70₁₈₉₋₁₉₂ y Δ Hsc70₁₈₉₋₁₉₅ con respecto a Δ Hsc70 silvestre, la adquisición de los resultados se llevó a cabo usando un Storm 840 Imager (Amersham Biosciences; GE Healthcare) y se realizó una cuantificación de la unión mediante el programa Quantity One (BIO-RAD).

3.4. Ensayo de interacción de CCT y Hsc70 Δ C por filtración en gel

Los complejos CCT:Hsc70 Δ C se formaron mediante la incubación de CCT y Hsc70 en una relación molar 1:10. La solución se incubó durante 20 minutos a 30 °C y se cargó en una columna superose 6 (Amersham Biosciences) de 2,54 ml conectada a un sistema SMART (Amersham Biosciences) previamente equilibrada en tampón D (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl y 1 mM PMSF). Antes de cargar la muestra en la columna, la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 10000 r.p.m en una microfuga EPPENDORF. El flujo que se impuso al sistema fue de 20 μ l/min y se recogieron fracciones de 25 μ l.

Posteriormente se analizaron por SDS-PAGE y Western-Blot todas las fracciones comprendidas entre los dos picos de peso molecular que aparecieron en el volumen de elución. Para la comprobación de la unión mediante anticuerpos, se utilizaron un anticuerpo anti-CCT α (91a, Stressgene) y otro anti-Hsp70/Hsc70 (Stressgene).

3.5. Preparación y purificación de los dominios Hsc70_{NBD} y Hsc70_{PBD}

La generación y purificación de los dos dominios estructurales de Hsc70 se realizó siguiendo el protocolo de Montgomery y cols. (1993) para el homólogo procariota de Hsc70, DnaK, pero con algunas modificaciones. En primer lugar, se dializó Hsc70 Δ C silvestre a una concentración de 5 mg/ml en el tampón de digestión (25 mM HEPES, 2 mM EDTA, pH 7,6) durante toda la noche. Tras la diálisis, se activó una solución de papaína (Sigma) a 0,25 mg/ml con una incubación en tampón 50 mM β -mercaptoetanol durante 30 minutos a 37 °C. La reacción de digestión se inició al añadir la papaína activada a la solución de Hsc70 Δ C en un relación 1:200 (p/p). Esta digestión se incubó a 26 °C en un baño de agua durante 90 minutos. Cada 15 minutos se recogieron alícuotas de la digestión para comprobar en qué tiempo se había producido una rotura total de Hsc70 Δ C en sus dos dominios estructurales. Después de la incubación, la papaína se inhibió irreversiblemente por la adición de E-64 (Sigma) a una concentración final de 140 mM.

Una vez finalizada la reacción de digestión y aprovechando que el N-terminal de Hsc70 Δ C posee una cola de histidinas (6x), se cargó la mezcla de los fragmentos generados en una columna de afinidad HisTrap HP (Amersham Biosciences) de 1 ml previamente equilibrada con tampón E (10mM Tris-.HCl, pH 7,2, 50 mM NaCl, 10%(v/v)) y se eluyó con un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna desde 0 a 200 mM de imidazol en tampón E. Mientras que Hsc70_{PBD} se recogió con la fracción proteica que no se pegó a la columna de afinidad, Hsc70_{NBD} eluyó a una concentración de 150 mM de imidazol. Las fracciones correspondientes a cada fragmento se mezclaron y se concentraron utilizando una unidad de filtración AMICON. Por último, los dominios de Hsc70 Δ C se analizaron en gel desnaturalizante y por espectrometría de masas.

3.6. Identificación de los dominios Hsc70_{NBD} y Hsc70_{PBD} por espectrometría de masas

- **Digestión en gel**

Las bandas de los fragmentos de Hsc70 Δ C purificados en el apartado anterior fueron recortadas manualmente del gel y procesadas de forma automática en una estación de digestión y preparación Proteiner DP (Bruker Daltonics, Bremen, Germany; Houthaevé y cols., 1995). El protocolo de digestión empleado fue el utilizado por Schevchenko y colaboradores en 1996 pero con ligeras variaciones: las bandas fueron lavadas con 25 μ l de bicarbonato amónico 50 mM y luego con 25 μ l acetonitrilo. En ese momento, se procedió a la reducción con DTT 10 mM en bicarbonato amónico 25 mM a 56 °C durante 20 minutos y la alquilación con iodoacetamida 50 mM en bicarbonato amónico 50 mM a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, las bandas fueron lavadas con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo y se secaron a 40 °C. Se añadió a las bandas secas tripsina porcina modificada para secuenciación (Promega), a una concentración final de 15 ng/ μ l en bicarbonato amónico 25 mM 50% acetonitrilo, y se dejó una primera etapa de digestión durante 45 min a 4 °C. Se añadió bicarbonato amónico 50 mM para que prosiguiese la segunda etapa de digestión durante 4 horas más a 37 °C. Se procedió a la extracción de los péptidos trópicos con TFA 0.5% durante 15 minutos. La muestra se secó con calor en una centrifuga de vacío y posteriormente se reconstituyó en 4 μ l de TA (solución de acetonitrilo acuoso al 33% con ácido trifluoroacético al 0.1%) sonicando la muestras durante 3 minutos.

- **Obtención de la huella peptídica mediante MALDI y búsqueda en bases de datos**

Se depositó manualmente una alícuota de 0,7 μ l de solución matriz (ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico 1 g/L en acetonitrilo acuoso al 33% con ácido trifluoroacético al 0,1%) en un portamuestras MALDI AnchorChip de 600 μ m que se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 0,7 μ l de la mezcla de péptidos eluidos y se dejó secar de nuevo a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron de manera automática en un espectrómetro de masas MALDI-TOF (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*; Desorción e ionización mediante

láser asistida por matriz con tiempo de vuelo) Bruker Reflex™ IV (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Alemania), equipado con fuente de iones SCOUT, en modo reflector positivo empleando extracción retardada de iones. El voltaje de aceleración de los iones fue de 23 kV. Cada espectro fue calibrado internamente empleando determinadas señales provenientes de la autoproteólisis de la tripsina. De esta forma la precisión en la medida de las masas se situó típicamente en ± 30 p.p.m. Las masas correspondientes a péptidos trípticos registradas se enviaron automáticamente a través del programa MS BioTools al programa Mascot™ (Matrix Science, Londres, Reino Unido) para efectuar la búsqueda en la base de datos NCBIInr. Respecto a esta búsqueda, no se establecieron restricciones de taxonomía debidas a la especie de origen, se permitió la pérdida de un corte tríptico y la tolerancia se fijó en 100 p.p.m. El número mínimo de péptidos trípticos necesarios para el ajuste fue de 4, siendo el p-valor en todo caso inferior al fijado como significativo.

3.7. Purificación de DnaK silvestre

Tanto la proteína DnaK silvestre como DnaK₁₈₅₋₁₉₁ y DnaK_{NBD} fueron amablemente cedidas por el Doctor Arturo Muga de la Universidad del País Vasco. Para la purificación de DnaK y el mutante derivado de esta proteína, se utilizó la cepa BB1553 (Bukau y cols., 1989). Las células se cultivaron en medio LB con ampicilina y cloramfenicol 0,1 mg/ml a 30 °C con agitación hasta $A_{600} = 0,7-0,8$. El extracto celular se preparó con tratamiento con lisozima y sonicación a 4 °C. Se centrifugó el lisado celular durante 30 minutos a 35000 r.p.m. en un rotor Beckman 70.38. Los sobrenadantes se cargaron en una columna de intercambio aniónico Q-sepharose de 90 ml equilibrada en tampón F (20 mM Tris-HCl, pH 7,2, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA y 2 mM DTT) y se eluyó con un gradiente de 4 volúmenes de columna desde 50 a 500 mM NaCl. Las fracciones que contenían DnaK se recogieron y después de la adición de 5 mM MgCl₂ se recircularon sobre una columna ATP-agarosa (Sigma) de 5 ml equilibrada en tampón G (20 mM Tris-HCl, pH 7,2, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA y 5 mM MgCl₂). La columna se lavó con tampón G suplementado con 2M NaCl, y las proteínas adheridas se eluyeron con 20 ml de tampón G más 5 mM de ATP. Esta fracción se dializó 12 horas en tampón H (10 mM Na-fosfato, pH 6,8, 15 mM β -mercaptoetanol) y se cargó en una columna de hidroxapatito de 15 ml equilibrada con

tampón con 10 volúmenes de columna. La proteína DnaK purificada se concentró en filtros Centriprep (Millipore) y el nucleótido unido se eliminó mediante al menos 4 diálisis consecutivas de 24 horas frente 1000 volúmenes de tampón I (20 mM imidazol, pH 7,2, 2 mM EDTA y 10%(v/v) glicerol). Finalmente, la proteína se dializó frente al tampón J (25 mM HEPES, pH 7,6, 10%(v/v) glicerol 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 2 mM DTT). La eficiencia de la eliminación del nucleótido se midió por A260/A280 ($\leq 0,7$). DnaK se analizó en gel desnaturalizante, y tras la comprobación de su pureza se alicuoteó, se congeló en nitrógeno líquido y las alícuotas se mantuvieron a -20 °C.

3.8. Purificación de DnaK_{NBD}

La purificación de DnaK_{NBD} se llevó a cabo de forma similar a la purificación de la proteína silvestre con las siguientes modificaciones: a lo largo de la purificación de DnaK_{NBD} se incluyó un 5%(v/v) de glicerol en todos los tampones y se realizó un paso adicional de purificación mediante cromatografía de filtración en gel. Las fracciones obtenidas de la columna ATP-agarosa se cargaron en una columna Superdex 75 (Amersham Biosciences), equilibrada con el tampón J con 5%(v/v) de glicerol.

3.9. Preparación de muestras para microscopía electrónica

Los complejos CCT:Hsc70_{NBD} se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en la misma relación molar que el caso de los experimentos bioquímicos anteriormente descritos, y se incubaron durante 20 minutos. La solución se incubó durante 1 minuto sobre rejillas de Cu/Rh con una capa de carbón previamente ionizada. Las rejillas se secaron y se tiñeron posteriormente con acetato de uranilo al 2% durante 1 min. Las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico JEOL 1200EX-II equipado con un filamento de wolframio y operado a 100 KV. Las micrografías electrónicas se obtuvieron bajo condiciones de mínima dosis (en torno a 10 e⁻/Å²) y 0° de inclinación a una magnificación nominal de 60.000 aumentos en película Kodak SO-163.

3.10. Preparación de muestras para inmunomicroscopía

Para determinar la subunidad o subunidades de CCT implicadas en la unión con Hsc70_{NBD}, se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-CCT α (91a, Stressgene), anti-CCT δ (8g, StressGene) y anti-CCT ϵ (eAD1, epsilon apical domain 1, clone PK/29/23/8d/6b, Serotec). En primer lugar se incubó CCT y Hsc70_{NBD} en la misma relación molar que en los ensayos bioquímicos de unión. Se incubaron las mezclas durante 20 min a temperatura ambiente y a ellas se les añadió posteriormente los anticuerpos en una relación molar 1:10 (CCT:anticuerpo). Las mezclas se incubaron durante 20 min a 30 °C y posteriormente se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% sobre rejillas de Cu/Rh. La tinción, la visualización de las muestras y la toma de fotografías se realizaron como se ha descrito anteriormente.

3.11. Preparación de muestras para criomicroscopía electrónica

Para el análisis de los complejos CCT:Hsc70_{NBD} por criomicroscopía, éstos se incubaron en rejillas de cobre agujereadas (Quantifoil) cubiertas con una película de carbón previamente ionizada para aumentar su hidrofiliidad y por tanto así, aumentar la cantidad de complejos adheridos a la rejilla. Posteriormente, la rejilla se secó con papel de filtro y se lanzó sobre un baño de etano líquido mediante una guillotina para su congelación a alta velocidad. De esta forma, los complejos de CCT:Hsc70_{NBD} se quedaron incluidos en la capa de hielo vítreo conservando su estado nativo. Una vez vitrificada la muestra, se empleó un criobrazo modelo GATAN 626.53P50, enfriado a temperaturas por debajo de -170 °C, para cargar la muestra en el microscopio Tecnai G²FEG 200 (FEI) equipado con un anticontaminador y estabilizado a 200 kV. Las imágenes se registraron a 62000 aumentos en micrografías electrónicas (Kodak SO-163) bajo condiciones de mínima dosis ($<10 \text{ e}^-/\text{Å}^2$) que reducen los daños por radiación.

3.12. Digitalización

Las micrografías se digitalizaron mediante un microdensitómetro Photoscan TD (Zeiss-INTERGRAPH) y se utilizó para ello un intervalo de muestreo variable en función del aumento utilizado. De esta manera, la micrografías de todas las muestras de tinción negativa se digitalizaron a 3,5 Å/píxel y a 3,2 Å/píxel las muestras vitrificadas.

3.13. Procesamiento de imágenes procedentes de tinción negativa.

Las partículas de los complejos CCT:Hsc70_{NBD} se extrajeron de las imágenes mediante herramientas del paquete XMIPP (Sorzano y cols., 2004). Para su clasificación bidimensional, se seleccionaron, clasificaron y promediaron las vistas frontales de CCT utilizando un refinamiento multireferencia de máxima probabilidad (maximum-likelihood; Scheres y cols., 2005) incluido en el paquete XMIPP.

Las micrografías de los inmunocomplejos CCT:Hsc70_{NBD}:anticuerpo (anti-CCT α , anti-CCT β y anti-CCT δ) se extrajeron de las micrografías digitalizadas y alineadas empleando algoritmos libres de patrón (Penczek y cols., 1992), y se clasificaron utilizando algoritmos SOM (mapas auto-organizativos) (Pascual-Montano y cols., 2001). En base a este algoritmo, una vez alineadas las partículas, éstas se sometieron a este método de separación en el que se buscan las diferencias en el exterior de la cavidad de CCT, lugar donde se asientan Hsc70_{NBD} y los anticuerpos correspondientes. Mediante la utilización de este método se consiguió separar las partículas de CCT sin Hsc70_{NBD} o anticuerpo de aquéllas que los poseen. Las poblaciones de los inmunocomplejos clasificados fueron entonces alineadas y centradas de nuevo para prevenir la influencia de las partículas descartadas en el anterior alineamiento. Por último, las partículas seleccionadas se promediaron utilizando un refinamiento multireferencia de máxima probabilidad incluido en el paquete XMIPP (Sorzano y cols., 2004).

3.14. Reconstrucción tridimensional del complejo CCT:Hsc70_{NBD}

Las partículas de los complejos CCT:Hsc70_{NBD} se extrajeron de las imágenes digitalizadas mediante el paquete XMIPP (Sorzano y cols., 2004). Para generar el modelo inicial y su posterior refinamiento se emplearon 14100 partículas que cubrían un rango de desenfoque de 10000 Å a 30000 Å y se utilizó la técnica de líneas comunes incluida en las herramientas del paquete EMAN (Ludtke y cols., 1999) aplicando simetría ocho durante todo el proceso. Tras diez ciclos de refinamiento, se utilizaron las 4097 partículas con el coeficiente de correlación más elevado como referencia inicial en una clasificación tridimensional ML3D incluida en el paquete XMIPP (Scheres y cols.,

2007) para separar las proyecciones de los complejos CCT:Hsc70_{NBD} de las proyecciones de CCT que no estaban formando complejos con Hsc70. Tras el proceso de clasificación, las 1218 partículas asignadas a los complejos CCT: Hsc70_{NBD} fueron utilizadas para la reconstrucción final del complejo. Para el refinamiento de estas partículas, se utilizaron las técnicas de alineamiento multirreferencia en espacio real y de reconstrucción tridimensional por retroproyección implementadas en SPIDER (Frank y cols., 1996). La reconstrucción final se obtuvo sin emplear ningún tipo de simetría y la resolución del mapa se determinó por el criterio FSC (Fourier Shell Correlation, Unser y cols., 1987) a un valor de 0,3.

3.15. Ajuste de la estructura atómica de Hsc70_{NBD} en la reconstrucción tridimensional de los complejos CCT:Hsc70_{NBD}

El ajuste de la estructura atómica de CCT:Hsc70_{NBD} en el mapa de densidad a 26 Å del complejo CCT:Hsc70_{NBD} se realizó de forma manual empleando Amira (<http://amira.zib.de>) y se comprobó el resultado empleando el programa CoLoRes/SITUS (Chacón y Wriggers, 2002). Este programa está basado en un buscador de superficies en el cual la estructura atómica se ajusta a la resolución del volumen de microscopía electrónica y posteriormente se superponen ambas superficies hasta encontrar la mejor correlación. La estructura atómica de Hsc70_{NBD} fue extraída de Protein Data Bank (número de acceso pdb: 3HSC).

3.16. Alineamiento de secuencias y relaciones filogenéticas

Para la realización de los alineamientos de secuencia de diferentes miembros de las familias de proteínas Hsc70/Hsp70/DnaK/Hsp110, las secuencias homólogas de las proteínas se obtuvieron de las bases de datos de secuencia de proteínas mediante la utilización del programa Blast (Altschul y cols., 1995) y se alinearon usando los algoritmos ClustalW (Thompson y cols., 1994) y T-COFFEE (Notredame y cols., 2000).

El árbol filogenético que muestra las posibles relaciones evolutivas entre las proteínas de las familias Hsc70/Hsp70/DnaK/Hsp110 se obtuvo aplicando métodos de máxima

verosimilitud sobre el alineamiento múltiple de las secuencias completas de los diferentes miembros de las familias Hsc70/Hsp70/DnaK/Hsp110. El modelo evolutivo de mayor probabilidad se seleccionó utilizando el programa Protest (Abascal y cols., 2005) y el árbol se construyó a partir de él utilizando el programa PHYML (Guindon y Gascuel, 2003).

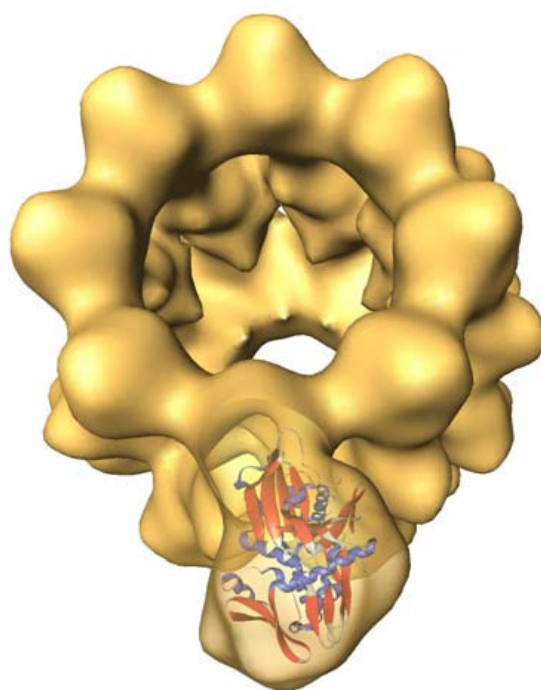
3.17. Dicroísmo circular

Se utilizó la técnica de dicroísmo circular (CD del inglés *Circular Dichorism*) para analizar la estructura secundaria de Hsc70 y de los mutantes generados. Las medidas de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de Hsc70 Δ C y los mutantes Hsc70₁₈₉₋₁₉₃ y Hsc70₁₈₉₋₁₉₅ se realizaron en un espectropolarímetro Jasco-715 (Jasco, Reino Unido), utilizando cubetas termostatzadas a 10 °C en tampón PBS pH 8,4. Los espectros se tomaron en una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico, a una concentración de proteína de 0,5 mg/ml, entre 180 y 260 nm. Se realizaron medias de 10 barridos para cada espectro. Tras la adquisición de los espectros se les restó la señal del tampón y se transformó la señal medida en mgrados (ϵ), en elipticidad molar por residuo [θ] ($\text{grados}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$). En los experimentos de estabilidad térmica, se midió la elipticidad molar por residuo a 222 nm en el intervalo de temperaturas 10 °C y 90 °C, se determinó utilizando cubetas de 1mm de paso óptico y una rampa de temperatura 1 °C/min.

3.18. Actividad ATPasa

Para comprobar la viabilidad funcional de los mutantes de Hsc70 se midió la actividad ATPasa de Hsc70 Δ C y los mutantes Hsc70₁₈₉₋₁₉₃ y Hsc70₁₈₉₋₁₉₅ añadiendo 20 μg de cada una de ellas en 25 μl de tampón A (10mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT and 2mM ATP) con 0.3% (v/v) de γ -³²P ATP (3000 Ci/mM; 10mM mCi/ml). Después de 5, 10 y 15 minutos de incubación a 30 °C, se cogieron alícuotas de 2 μl y se paró la reacción de hidrólisis de ATP añadiendo 2 μl de EDTA 50 mM.

4. Resultados



4.1. Purificación de CCT

El proceso utilizado para la purificación de la chaperonina CCT es una combinación de varios procedimientos publicados anteriormente con diversas modificaciones (Figura 4.1) (Gao y cols., 1992; Norcum y cols., 1996; Ferreira y Frydman, 2000; Martín-Benito y cols., 2002). El rendimiento final medio de una purificación a partir de 50 gramos de tejido testicular es de 3,5 mg, bastante más alto que los protocolos anteriormente publicados, debido en parte a la introducción de un gradiente de sacarosa descrito para la obtención de otras chaperonas (Quaite-Randall y Joachimiak, 1999), un paso de filtración en gel con una columna Superdex200 (Amersham Biosciences) y al proceso de concentración de la proteína en unidades de filtración AMICON (millipore).

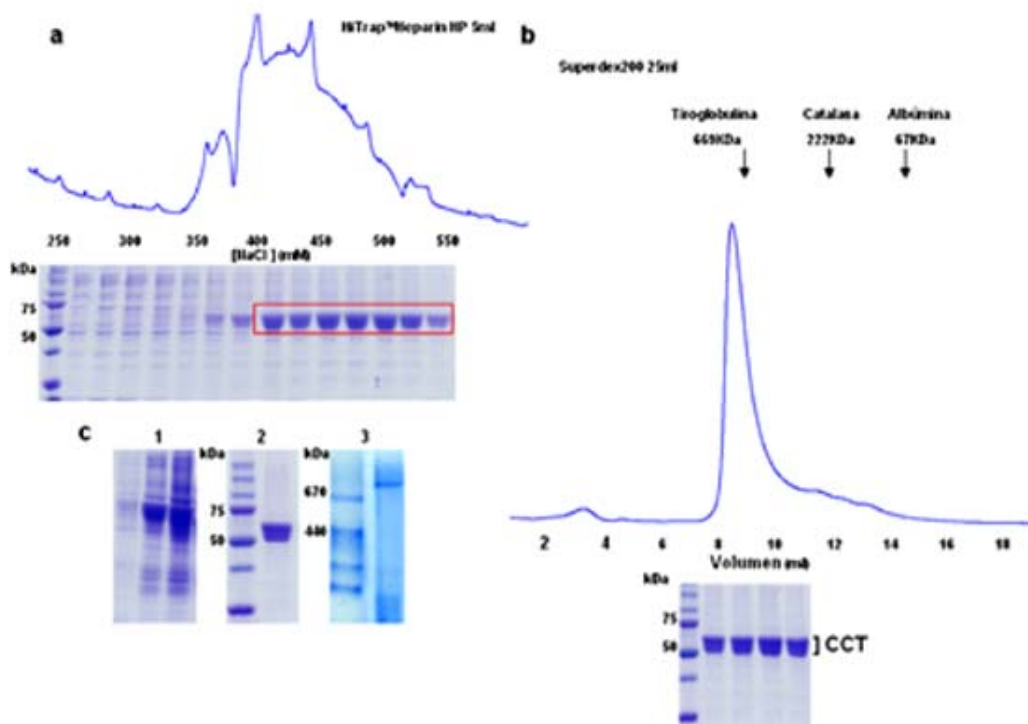


Figura 4.1: Purificación de CCT. (a) Perfil de elución de la columna de afinidad HiTrap™ Heparin HP de 5ml. En la parte inferior se muestra un gel desnaturalizante al 10% de las fracciones recolectadas (recuadro rojo). (b) Perfil de elución del gel de filtración de la columna Superdex200 de 25 ml. En el gel se muestran las fracciones de CCT obtenidas tras el paso de purificación. (c) 1 Gel desnaturalizante de las fracciones del gradiente de sacarosa. 2 Gel desnaturalizante de CCT concentrada. 3 Electroforesis nativa al 6% de acrilamida de CCT purificada.

El resultado final de la purificación del oligómero de CCT se comprobó por microscopía electrónica (Figura 4.2) y electroforesis nativa (Figura 4.1c). En geles nativos se observa una única banda a la altura del peso molecular del oligómero, lo que corrobora su pureza y la presencia del oligómero completo. El análisis de CCT en geles desnaturalizantes muestra que la pureza es superior al 95% (Figura 4.1c), porcentaje suficiente para su posterior ensayo de interacción con otras chaperonas y análisis estructurales a nivel de microscopía electrónica. Este porcentaje de pureza se debe en parte al último paso de purificación correspondiente a una cromatografía en gel de filtración en una columna Superdex200 (Amersham Biosciences) de 25 ml que ha permitido mejorar sustancialmente la calidad y pureza de las muestras de CCT (Figura 4.1b) y evitar así, la aparición de posibles artefactos en análisis estructurales a nivel de microscopía electrónica y en ensayos de interacción con otras proteínas.

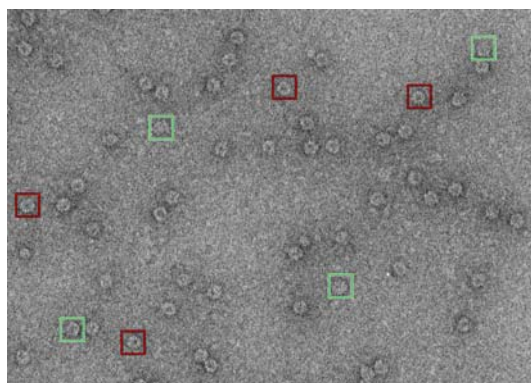


Figura 4.2: Micrografía de microscopía electrónica de CCT purificada. Los cuadros de color rojo y verde señalan vistas frontales y laterales de CCT, respectivamente.

4.2. Ensayo de interacción de CCT y Hsp70/Hsc70

Como se ha comentado anteriormente en la introducción, la cooperación entre chaperonas de las familias Hsp60 y Hsp70 se conoce desde hace ya algún tiempo, tanto en procariotas, a través de la colaboración existente entre la chaperonina GroEL y DnaK de *E. coli* (Deuerling y cols., 1999; Teter y cols., 1999; Kerner y cols., 2005) o en eucariotas, a través de la colaboración de CCT y Hsc70 (Lewis y cols., 1992; Frydman y cols., 1994; Hynes y cols., 1996; Siegers y cols., 2003). La cooperación entre ambas chaperonas podría ocurrir a través de la liberación, por parte de Hsc70, del sustrato unido a ésta hacia el interior de la cavidad de CCT. Con el fin de estudiar con mayor detalle el mecanismo de colaboración entre CCT y Hsc70 se realizó un ensayo de

interacción en el cual, CCT fue incubada con los dos representantes citosólicos de Hsp70, la forma constitutiva (Hsc70) y su homóloga sintetizada en situaciones de estrés celular (Hsp70), en una relación molar 1:10. Ambas chaperonas se incubaron con CCT y cargaron dichas soluciones en un gel nativo al 6% de acrilamida. La banda de CCT, que corre en el gel con una movilidad diferente que la de Hsc70 (Figura 4.3), fue cortada y posteriormente cargada en un gel desnaturante al 10%.

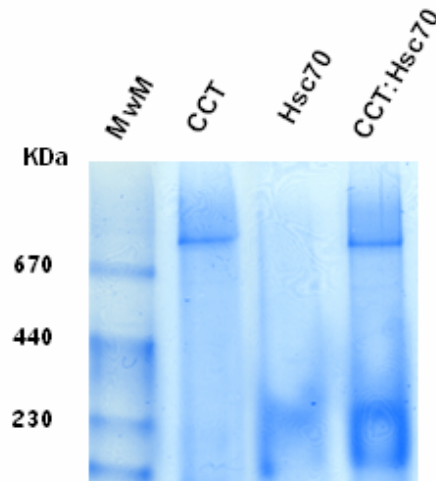


Figura 4.3: Ensayo de interacción de Hsp70/Hsc70 con CCT. Alicuotas de Hsc70, CCT y la mezcla de CCT y Hsc70 se corrieron en un gel nativo al 6% de acrilamida. La banda de CCT, formando o no complejos con Hsc70, corre con una movilidad diferente que Hsc70.

El gel desnaturante muestra las ocho bandas correspondientes a las diferentes subunidades de CCT junto con las bandas de Hsc70 y Hsp70 (Figura 4.4). Es decir, la chaperonina CCT interacciona con los dos miembros citosólicos de la familia Hsp70.

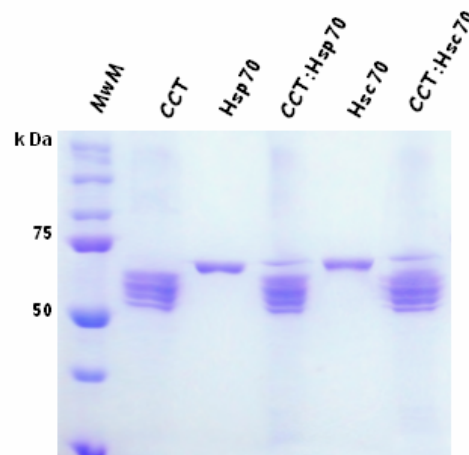


Figura 4.4: Unión de Hsc70 a CCT. CCT se incubó tanto con Hsp70 como Hsc70 y dichas soluciones se cargaron en un gel nativo (véase Fig. 4.2). La banda de CCT, que corre con diferente movilidad que ambas formas de Hsp70, se cortó y cargó en un gel SDS-PAGE al 10%. Las bandas correspondientes a CCT, Hsp70 y Hsc70 corresponden a controles de movilidad.

4.3 Purificación de Hsc70 Δ C

Como se ha comentado anteriormente, sólo recientemente se ha determinado la estructura atómica de Hsc70, aunque en realidad ha sido un mutante al que le faltan los últimos 106 aminoácidos de C-terminal, pero mantiene su completa funcionalidad con respecto a la proteína silvestre (Figura 4.5), (Hsc70 Δ C; Jiang y cols., 2005).

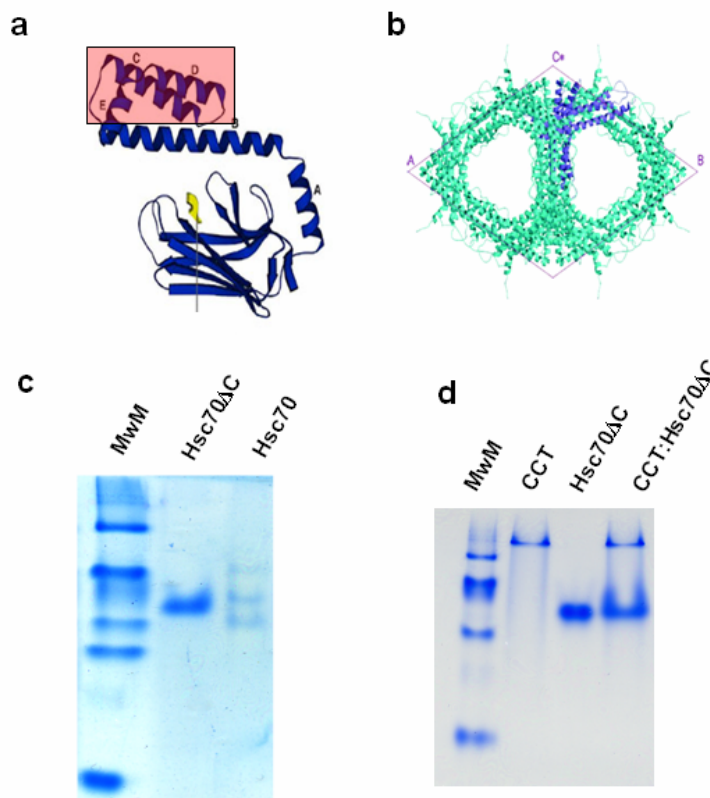


Figura 4.5: (a) Estructura de Hsc70_{PBD}. El cuadro coloreado en rojo muestra la región del C-terminal de Hsc70 truncada en Hsc70 Δ C. (b) Oligomerización que forma el extremo C-terminal (últimos 10kDa) de Hsc70. (c) Gel nativo que compara Hsc70 Δ C con Hsc70. La molécula completa de Hsc70 tiende a agregar (diferentes bandas en el pocillo Hsc70) debido a la oligomerización que tiene lugar en el extremo C-terminal de Hsc70. (d) El mismo ensayo de interacción que se realizó con Hsp/Hsc70 se realizó con Δ Hsc70.

El subdominio C-terminal de 10 kDa de Hsc70 provoca que ésta tienda a agregar generando diferentes estados de oligomerización (Figura 4.5b) (Benaroudj y cols., 1995, 1997; Chou y cols., 2003). Debido a ello, en todos los ensayos de interacción con CCT, así como en los análisis por microscopía electrónica, se utilizó la forma truncada de Hsc70 silvestre (Hsc70 Δ C) con el fin de evitar los posibles artefactos o agregados que

podiera generar ésta (Figura 4.5c) (Wilbanks y cols., 1995; Ungewickell y cols., 1997). Con este fin, Hsc70 Δ C se sobreexpresó en el sistema de expresión *E. coli* BL21(DE3)pLysS y se purificó después de varios pasos cromatográficos, tales como una columna de afinidad HiTrap-His HP de 1 ml y la columna de exclusión molecular Superdex200 de 25ml (Figura 4.6a y 4.6b). La pureza de Hsc70 Δ C se comprobó mediante análisis electroforético en condiciones nativas y desnaturalizantes (Figura 4.6c).

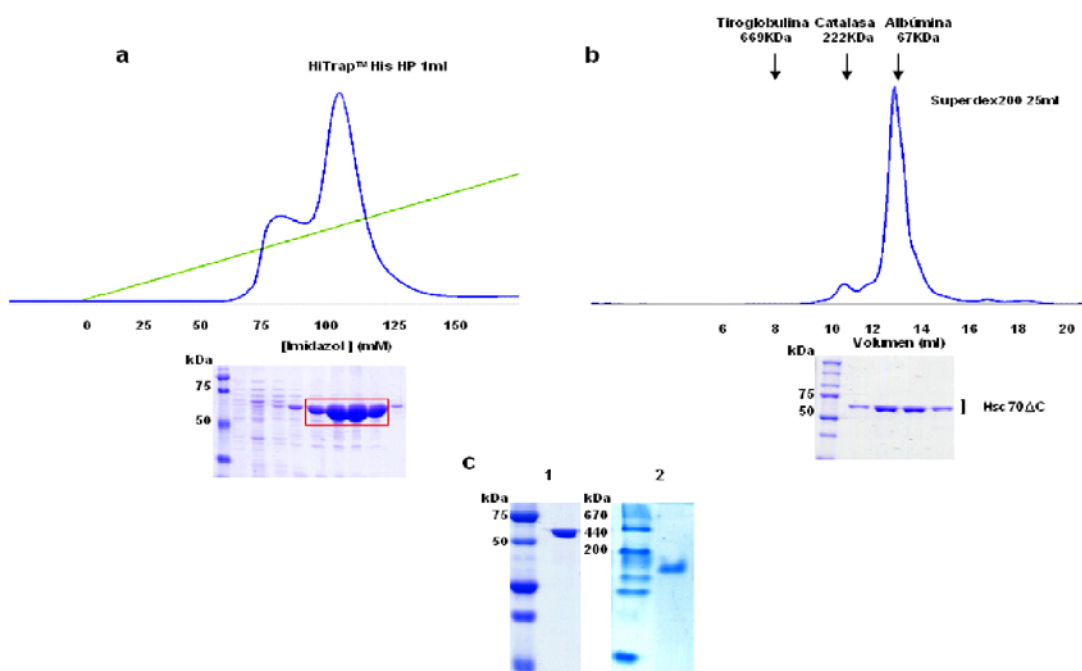


Figura 4.6: Purificación de Hsc70 Δ C. (a) Perfil de elución de la columna de afinidad HiTrap™ His HP de 1ml. En la parte inferior se muestra un gel desnaturalizante al 10% de las fracciones recolectadas (recuadro rojo). (b) Perfil de elución del gel de filtración de la columna Superdex200 de 25 ml. En el gel se muestran las fracciones de Hsc70 Δ C obtenidas tras el paso de purificación. (c). 1 Gel desnaturalizante de Hsc70 Δ C purificada y concentrada. 2 Electroforesis nativa al 6% de acrilamida de la fracción de Hsc70 Δ C purificada.

4.4. Ensayo de interacción de CCT y Hsc70 Δ C en gel de filtración

Para confirmar la interacción que existe entre las chaperonas CCT y Hsc70, observada mediante geles bidimensionales, se decidió realizar una cromatografía en gel de filtración. Se incubó CCT junto con Hsc70 Δ C durante 20 min a 30°C a una relación molar 1:10, y dicha solución se cargó una columna de exclusión molecular Superose 6

de 2,54 ml. El perfil cromatográfico obtenido durante la elución mostró dos picos, uno de bajo peso molecular correspondiente a Hsc70 Δ C y uno de peso molecular elevado correspondiente al complejo formado entre CCT y Hsc70 Δ C (Figura 4.7). De esta manera, CCT no solo interacciona con los dos representantes citosólicos, Hsp70 y Hsc70, sino también con la forma truncada pero totalmente funcional de Hsc70, Hsc70 Δ C.

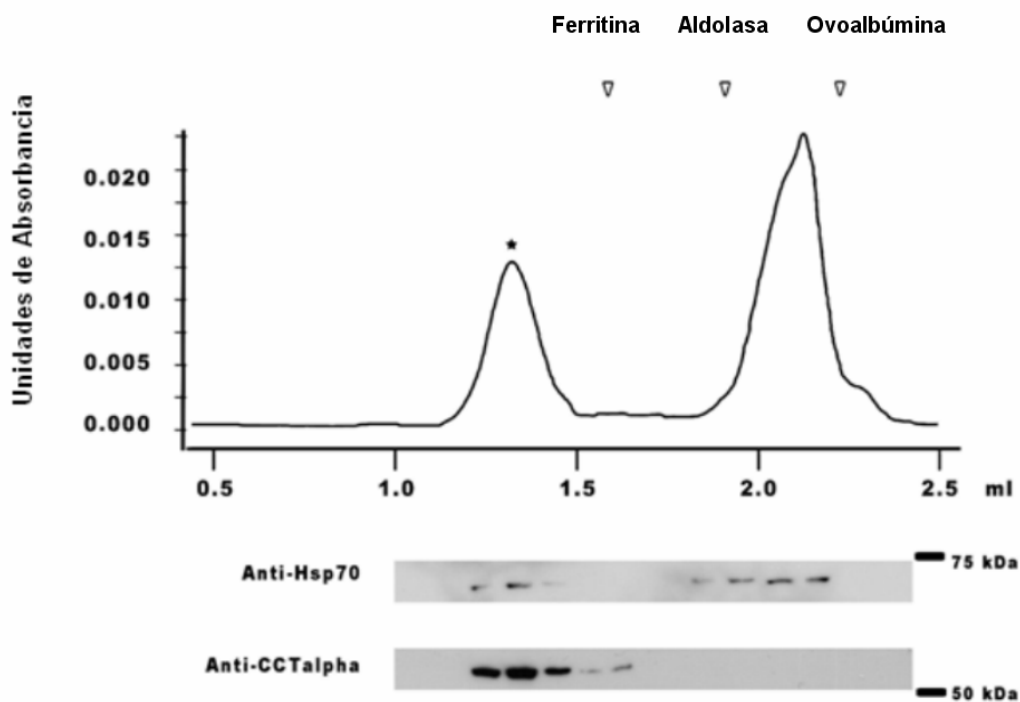


Figura 4.7: Gel de Filtración del experimento de interacción de Hsc70 con CCT. Una solución de CCT y Hsc70 Δ C (Jiang y cols, 2005) se cargó en una columna Superose 6 de 2,54 ml. Algunas de las fracciones recogidas se cargaron en un gel SDS-PAGE y las bandas se trataron con anticuerpos monoclonales anti-CCT α y anti-Hsp70/Hsc70. Las fracciones correspondientes al pico de un peso molecular alto (*) muestran una clara interacción entre ambas chaperonas.

4.5. Preparación y purificación de los dominios NBD y SBD de Δ Hsc70

Como se ha comentado anteriormente, todos los representantes de la familia de proteínas Hsp70 están compuestos por dos dominios diferentes, Hsc70_{NBD} (45 kDa) y Hsc70_{PBD} (25 kDa) (Figura 4.8). Con el fin de determinar si CCT se une por uno o ambos dominios de Hsc70, y así poseer más información acerca del mecanismo que

pueda controlar o regular el mecanismo de colaboración que se produce entre Hsc70 y CCT, se decidió separar los dominios Hsc70_{NBD} y Hsc70_{PBD} para su posterior ensayo de interacción con la chaperonina.

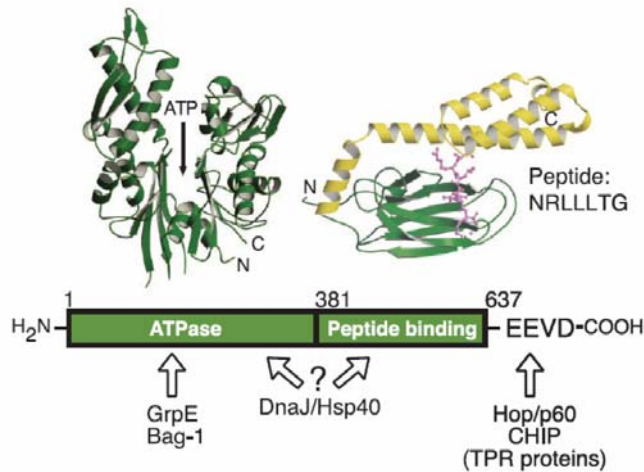


Figura 4.8. Esquema representativo de los dos dominios estructurales de Hsp70. En color verde se representa el Hsc70_{NBD} con el sitio de unión a ATP/ADP. En color amarillo se muestra el Hsc70_{PBD} junto a un péptido unido en el sitio de unión a sustrato. Las flechas de color blanco indican los sitios de unión de varios cofactores y cochaperonas que regulan las diferentes funciones de Hsp70 (Hartl y Hayer-Hartl, 2002).

Con este propósito, la purificación de los dos dominios funcionales de Hsc70 Δ C se realizó siguiendo un procedimiento utilizado para el homólogo procarionta de Hsc70 de *E. coli*, Dnak (Montgomery y cols., 1993) pero con algunas modificaciones. En primer lugar, se incubó Hsc70 Δ C con papaína, proteasa que realiza cortes en el pequeño lazo hidrófobo que une ambos dominios, a diferentes tiempos (Figura 4.9).

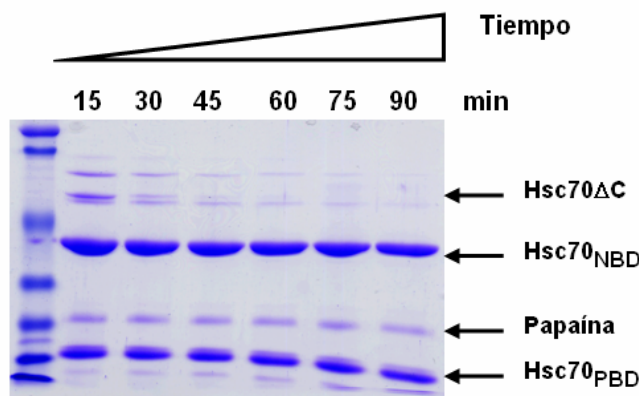


Figura 4.9: Digestión de Hsc70 Δ C con papaína a diferentes tiempos. Se realizó una digestión de Hsc70 a diferentes tiempos con el fin de obtener un tiempo idóneo de incubación que garantizase la completa digestión de Hsc70 Δ C en sus dos dominios estructurales: Hsc70_{NBD} y Hsc70_{PBD}.

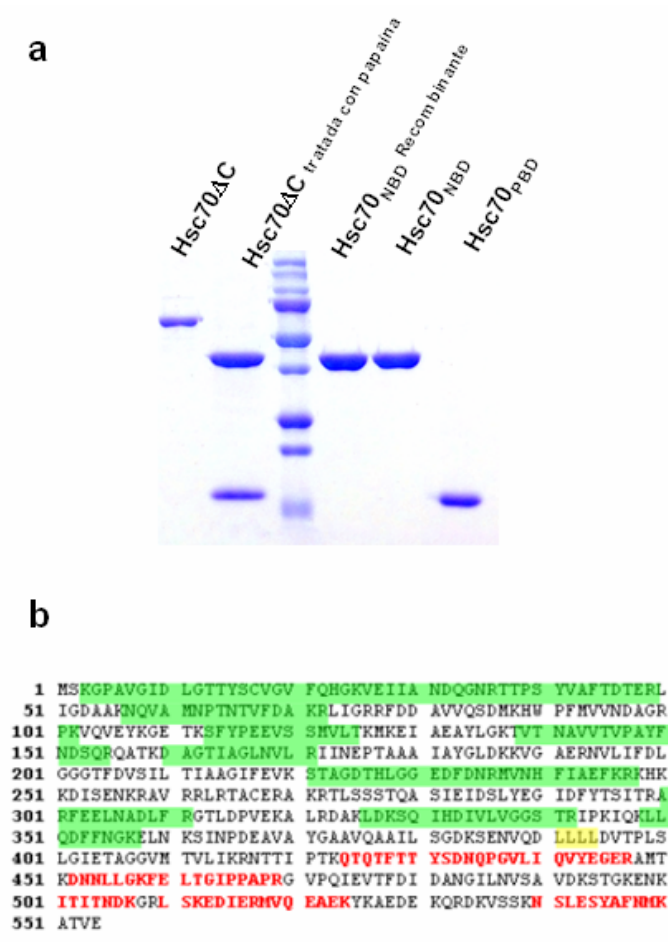


Figura 4.10: Proteólisis de Hsc70 Δ C en sus dos dominios, Hsc70_{NBD} (~ 45 kDa) y Hsc70_{PBD} (~ 20 kDa)
 . (a) Gel SDS-PAGE que muestra los dos dominios purificados de Hsc70 después de que Δ Hsc70 sufriera un tratamiento con papaína. (b) Secuencia de aminoácidos de la proteína bovina Δ Hsc70. El cuadro amarillo muestra el sitio de corte de la papaína (también corresponde al lazo que separa los dos dominios de Hsc70: Hsc70_{NBD} y Hsc70_{PBD}). Los residuos marcados en verde y en rojo corresponden a los péptidos identificados por MALDI-TOF de las secuencias de Hsc70_{NBD} y de Hsc70_{PBD} respectivamente.

Una vez determinado el tiempo de incubación en el cual se produce la digestión completa de Hsc70 Δ C en sus dos dominios funcionales, se inhibió la actividad proteolítica de la papaína con un inhibidor irreversible, como es E-64 (Sigma). Seguidamente se cargó la mezcla en una columna de afinidad HiTrap-His HP de 1 ml ya que, el N-terminal de Hsc70 Δ C posee una cola de histidinas que permite la unión del Hsc70_{NBD} a la resina. Después de aplicar un gradiente continuo de 0-200 mM de imidazol se logró purificar Hsc70_{NBD}. Hsc70_{PBD} se recogió en la fracción proteica que no se pegó a la resina. Posteriormente, los fragmentos purificados se concentraron, se analizaron en gel desnaturizante y se identificaron por MALDI-TOF (Figura 4.10).

Como se puede observar en la figura 4.9b, los péptidos identificados para el fragmento Hsc70_{NBD} (en verde) corresponden, todos ellos, a residuos situados en Hsc70_{NBD}. En este mismo sentido, los péptidos identificados para Hsc70_{PBD} (en rojo) pertenecen a Hsc70_{PBD}. En definitiva, los fragmentos purificados tras el tratamiento con papaína corresponden a los dos dominios funcionales de Hsc70 Δ C.

4.6. Ensayo de interacción de CCT con Hsc70_{NBD} y Hsc70_{PBD}

Para comprobar si uno o ambos dominios de Hsc70 Δ C interaccionan con CCT se incubó a Hsc70_{NBD} y Hsc70_{PBD}, independientemente, con CCT durante 20 min, a 30 °C en una relación molar (10:1). Posteriormente dichas soluciones se cargaron en un gel nativo al 6% de acrilamida y aprovechando la diferente movilidad de la chaperonina con los dos dominios estructurales de Hsc70 Δ C, se cortaron las bandas a la altura de CCT y se cargaron en un gel desnaturizante. Como se puede observar en la figura 4.11, el experimento de interacción revela que, mientras Hsc70_{PBD} no interacciona con CCT, Hsc70_{NBD} interacciona claramente con la chaperonina eucariota. De esta forma, se puede afirmar que CCT interacciona con Hsc70 Δ C y dicha interacción se produce a través de Hsc70_{NBD}.

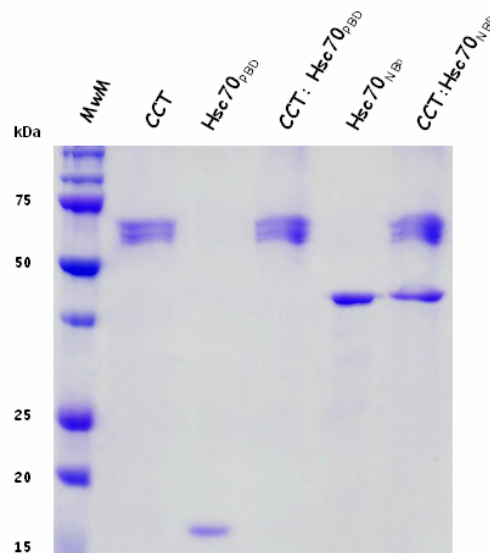


Figura 4.11: Ensayo de interacción de CCT con los dominios estructurales de Hsc70 Δ C. El mismo experimento que se muestra en fig. 4.2 se realizó con los dos dominios purificados de Hsc70 Δ C: Hsc70_{PBD} y Hsc70_{NBD}. Los dos dominios fueron incubados independientemente con CCT, se cargaron en un gel nativo al 6% de acrilamida y las bandas a la altura de CCT se cargaron en un gel SDS-PAGE. CCT, Hsc70_{PBD} y Hsc70_{NBD} se utilizaron como controles de movilidad.

4.7. Procesamiento bidimensional de los complejos CCT:Hsc70_{NBD}

El siguiente objetivo que se planteó en esta tesis doctoral fue confirmar la interacción de CCT y Hsc70 por microscopía electrónica con tinción negativa. Con este propósito, se generaron complejos CCT:Hsc70_{NBD} en la misma relación molar que en el caso de los experimentos bioquímicos anteriormente descritos, y se incubaron durante 20 minutos. Las partículas de los complejos se seleccionaron, clasificaron y promediaron utilizando un refinamiento multireferencia de máxima probabilidad (maximum-likelihood; Scheres y cols., 2005). La imagen media final obtenida a partir de 1190 partículas (Figura 4.12a) muestra una masa similar al tamaño del dominio ATPasa de Hsc70 interaccionado por el exterior de CCT con una de sus subunidades.

Para determinar si la unión de Hsc70_{NBD} se produce a través de una subunidad específica de CCT, se incubaron independientemente alícuotas de los complejos CCT:Hsc70_{NBD} con tres anticuerpos monoclonales diferentes que reconocen regiones de los dominios apicales de CCT α (91; Hynes y cols., 1995), CCT ϵ (ϵ AD1; Llorca y cols., 2000) y CCT δ (8g; Llorca y cols., 1999). Las partículas de los inmunocomplejos CCT:Hsc70_{NBD}:anticuerpo se alinearon empleando algoritmos libre de patrón (Penczek y cols., 1992), se clasificaron utilizando algoritmos SOM (mapas auto-organizativos) (Pascual-Montano y cols., 2001) y se promediaron utilizando un refinamiento multireferencia de máxima probabilidad.

En base a la diferente disposición de las subunidades de CCT dentro de un anillo (Figura 4.12b) (Liou y Willison, 1997), las tres imágenes medias finales (2895 partículas para anti-CCT α (Figura 4.12c), 2115 partículas para anti-CCT ϵ (Figura 4.12d) y 3253 partículas para anti-CCT δ (Figura 4.12e)) apuntan a CCT β como la subunidad de CCT involucrada en la interacción con el dominio ATPasa de Hsc70.

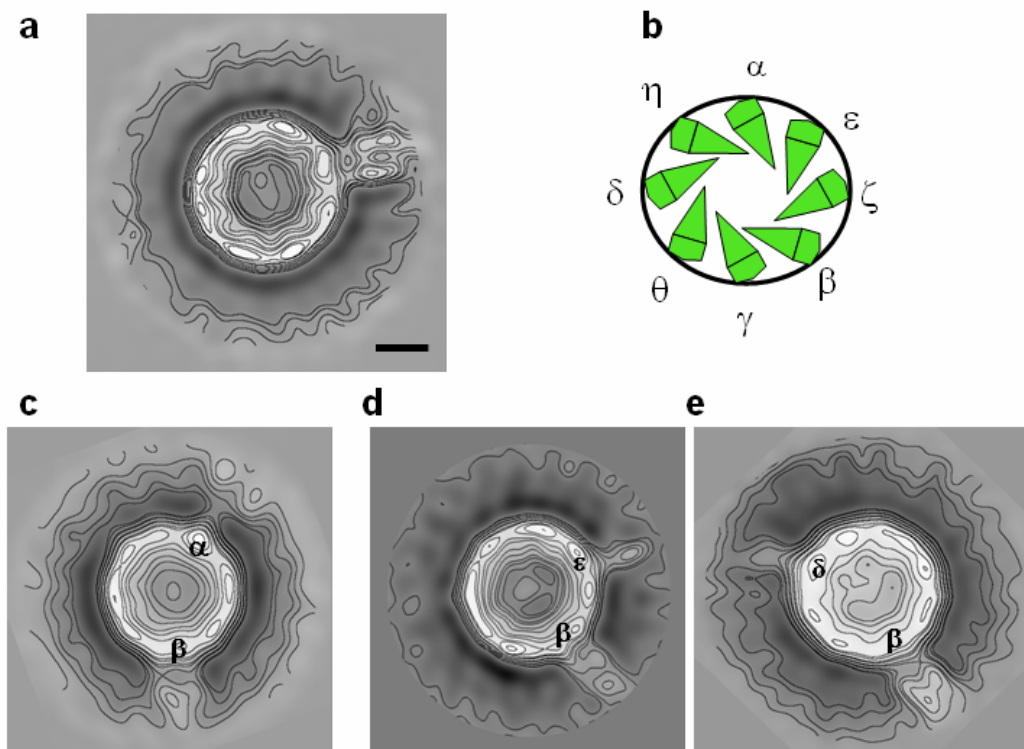


Figura 4.12: Estructura del complejo CCT:Hsc70_{NBD}. (a) Imagen media bidimensional del complejo formado por CCT y Hsc70_{NBD}. (b) Modelo de la disposición de las subunidades de CCT dentro de un anillo (Liou y Willison, 1997). (c, d y e) Medias bidimensionales de los inmunocomplejos formados por los complejos CCT: Hsc70_{NBD} y los anticuerpos monoclonales anti-CCT α 91A, anti-CCT ϵ ϵ AD1 y anti-CCT δ 8g, respectivamente. La barra de escala corresponde a 50 Å.

4.8. Reconstrucción tridimensional de los complejos CCT:Hsc70_{NBD}

Para caracterizar con mayor detalle la interacción de CCT con Hsc70 se realizó una reconstrucción tridimensional del complejo. De esta manera, alícuotas de los complejos CCT:Hsc70_{NBD} fueron vitrificadas para la posterior realización de criomicroscopía electrónica. Se reconstruyó un volumen tridimensional inicial a partir de 14100 partículas utilizando técnicas de líneas comunes del paquete EMAN (Ludtke y cols., 1999) y aplicando simetría ocho durante todo el proceso (Figura 4.13).

Tras la reconstrucción tridimensional del volumen inicial se realizó una clasificación tridimensional ML3D incluida en el paquete XMIPP (Scheres y cols., 2007) para separar las imágenes de las proyecciones de los complejos CCT:Hsc70_{NBD} de las proyecciones de CCT que no formaban complejos con Hsc70 (Figura 4.14).

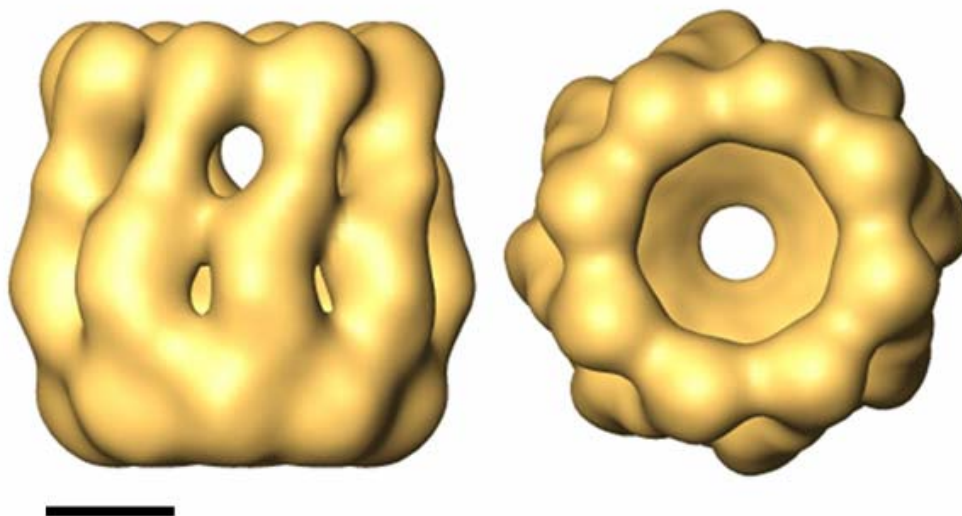


Figura 4.13: Vista lateral y frontal del volumen inicial utilizado para el posterior refinamiento y reconstrucción del complejo formado entre CCT:Hsc70_{NBD}. La barra de escala corresponde a 50 Å.

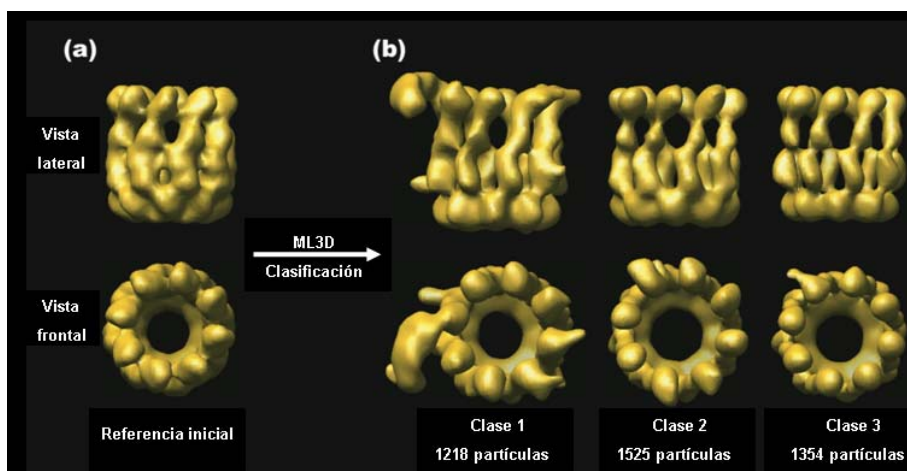


Figura 4.14: Clasificación por ML3D de las partículas de criomicroscopía electrónica del complejo CCT: Hsc70_{NBD}. A partir de las 4097 partículas que habían generado el volumen inicial (a) se procedió a la clasificación ML3D (Scheres y cols, 2007) utilizando tres clases diferentes. (b) Tras 14 iteraciones de clasificación, el resultado final se interpretó como complejos CCT:Hsc70_{NBD} (clase1) y partículas de CCT (clases 2 y 3). También se muestra el número de partículas pertenecientes a cada clase.

Tras el proceso de clasificación, las 1218 partículas asignadas a los complejos CCT:Hsc70_{NBD} fueron utilizadas para la reconstrucción tridimensional del complejo. La resolución final del mapa en base al criterio 0,3 es de 26 Å (Figura 4.15). La reconstrucción final muestra la estructura típica de doble anillo que posee la

chaperonina citoplasmática interaccionando con una masa con forma triangular en uno de los dominios apicales de CCT (Figura 4.16).

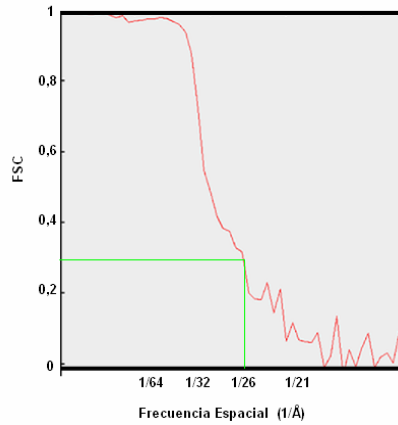


Figura 4.15: Resolución de la reconstrucción tridimensional del complejo CCT:Hsc70_{NBD}. La resolución se determina midiendo la correlación de las “capas” de Fourier de dos reconstrucciones tridimensionales independientes (van Heel y Harauz, 1988). La FSC (del inglés *Fourier shell correlation*) mide el coeficiente de correlación cruzado normalizado entre dos volúmenes tridimensionales en función de la frecuencia espacial. La resolución puede determinarse como el recíproco de la frecuencia espacial donde el coeficiente de correlación se iguala a 0,3 dando un valor de 26 Å.

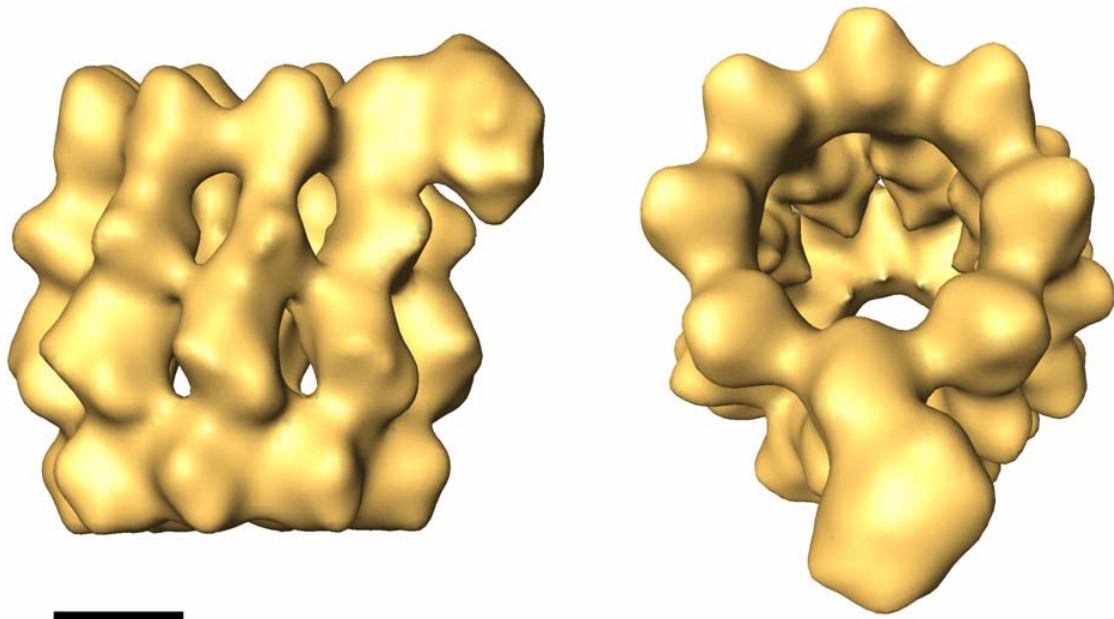


Figura 4.16: Reconstrucción tridimensional del complejo CCT:Hsc70_{NBD} por criomicroscopía electrónica. Vista frontal y lateral de la reconstrucción obtenida para el complejo que forman las chaperonas CCT y el dominio ATPasa de Hsc70. La barra de escala corresponde a 50 Å.

4.9. Ajuste de la estructura atómica de Hsc70_{NBD} en la reconstrucción tridimensional del complejo CCT:Hsc70_{NBD}

Con la finalidad de entender de forma más precisa los resultados obtenidos en el procesamiento bidimensional y la reconstrucción tridimensional, se realizó un ajuste manual de la estructura atómica de Hsc70_{NBD} (número de acceso pdb: 3HSC) dentro del volumen del complejo CCT:Hsc70_{NBD} y posteriormente se refinó el resultado con el programa CoLoRes de SITUS (Chacón y Wriggers, 2002; Figura 4.17). Como se puede observar, la estructura atómica de Hsc70_{NBD} se acomoda en la masa adicional que está en contacto con uno de los dominios apicales de la chaperonina y apunta a la base en forma de “V” de Hsc70_{NBD}, la región comprendida entre V₁₈₉GARENV₁₉₅ (Figura 4.18a), como la zona involucrada en la interacción con CCT.

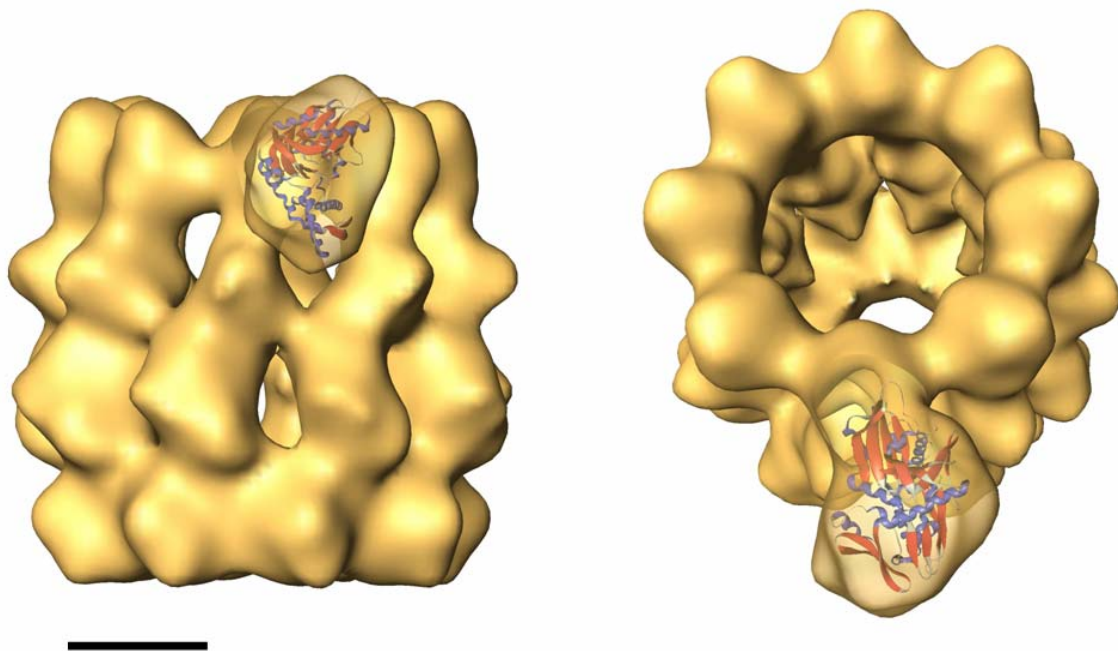


Figura 4.17: Ajuste de la estructura atómica de Hsc70_{NBD} (el número de acceso pdb del dominio Hsc70_{NBD} de Hsc70 es: 1YUW) dentro de la masa correspondiente de la reconstrucción tridimensional del complejo CCT:Hsc70_{NBD}. La barra de escala corresponde a 50 Å.

4.10. La interacción entre Hsp60 y Hsp70 sólo se produce en organismos eucariotas

La región de Hsc70_{NBD} que apunta como posible sitio de unión a CCT (Figura 4.18a) corresponde a una región muy diferente en eucariotas y procariontas (Figura 4.18b) pero está muy conservada en los miembros eucariotas de la familia Hsc70/Hsp70. Esta secuencia corresponde al lazo situado entre la hélice- α G y la lámina- β 12 y, parte del N-terminal de esta misma lámina- β (Figura 4.18a).

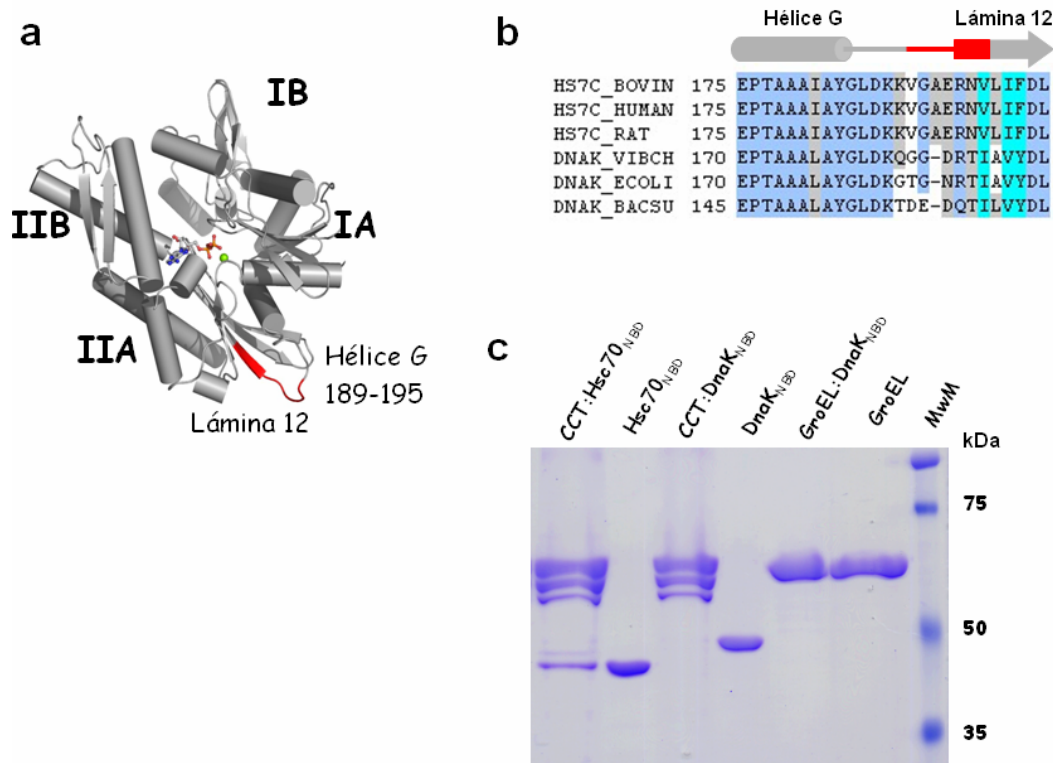


Figura 4.18: Interacción específica de CCT y Hsc70. (a) Estructura del dominio ATPasa de Hsc70 (Hsc70_{NBD}; número de acceso pdb:3HSC). Las α -hélices están representadas como cilindros y las láminas β como flechas. El posible sitio de unión a CCT está coloreado en rojo. También se representan los 4 subdominios en los que se divide Hsc70_{NBD}. (b) Alineamiento de secuencias de Hsc70 (bovino, humano y rata) y DnaK (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* and *Bacillus subtilis*). Dicho alineamiento se centra en el sitio de unión a CCT. (c) Ensayo de unión de las chaperoninas CCT y GroEL a Hsc70_{NBD} y a su homólogo procarionta DnaK_{NBD}. Las líneas de GroEL, Hsc70_{NBD} y DnaK_{NBD} corresponden a controles de movilidad. Los experimentos de interacción se realizaron como se describe en la fig. 4.2.

Con el fin de estudiar la importancia del posible sitio de unión de Hsc70_{NBD} a CCT se realizó un ensayo de interacción mediante geles bidimensionales, tal y como se ha

descrito para los casos anteriores, con CCT y el dominio ATPasa del homólogo procariota de Hsc70, DnaK (DnaK_{NBD}). Como se puede observar en la figura 4.18c, CCT no interacciona con DnaK_{NBD}, lo que sugiere que CCT interacciona específicamente con Hsc70/Hsp70. De la misma manera, se realizó un ensayo de interacción a CCT con toda la molécula de DnaK (Figura 4.19a). De igual forma que ocurrió con DnaK_{NBD}, DnaK no interacciona con la chaperonina eucariota. Para tratar de esclarecer si la interacción observada entre CCT y Hsc70 es específica de organismos eucariotas, se realizó un ensayo de interacción mediante gels bidimensionales entre GroEL y DnaK (Figura 4.18c; Figura 4.19a). Como se puede observar, la chaperonina procariota no interacciona con DnaK_{NBD} ni con DnaK. En este sentido, la interacción entre CCT y Hsc70 es muy específica porque Hsc70 no interacciona con GroEL (Figura 4.19b).

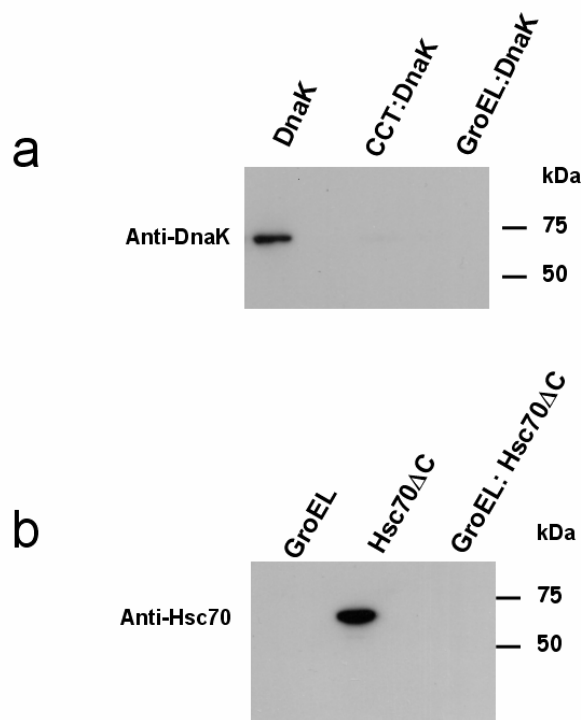


Figura 4.19: Unión específica de CCT y Hsc70. (a) DnaK, homólogo procariota de Hsc70, se incubó con CCT y GroEL, se corrió un gel nativo y las bandas correspondientes a las chaperoninas (CCT y GroEL) se cortaron y se cargaron en un gel SDS-PAGE. Posteriormente se realizó una transferencia a una membrana de nitrocelulosa y se incubó con un anticuerpo monoclonal que reconoce a DnaK (línea izquierda), la cual se corrió como control positivo. El experimento muestra que DnaK no interacciona ni con CCT ni GroEL. (b) El mismo ensayo realizado en (a) se llevó a cabo con Hsc70ΔC y GroEL. La mezcla de ambas proteínas se corrió en un gel nativo y la banda correspondiente a GroEL se cargó en un gel SDS-PAGE. Tras una transferencia a una membrana de nitrocelulosa se incubó con un anticuerpo monoclonal específico de Hsc70 (línea central). El ensayo muestra que Hsc70 no interacciona con GroEL.

El sitio de unión a CCT de Hsc70_{NBD} es una región poco conservada entre los representantes homólogos procariotas de Hsc70 pero también en un grupo de chaperonas con una gran homología a la Hsp70 que son las Hsp110 (Figura 4.20a). Esta familia de proteínas forman complejos estables con Hsc70/Hsp70 y recientemente se ha descrito que actúan como intercambiadores de nucleótido de Hsp70 (Dragovic y cols., 2006; Raviol y cols., 2006; Shaner y cols. 2006).

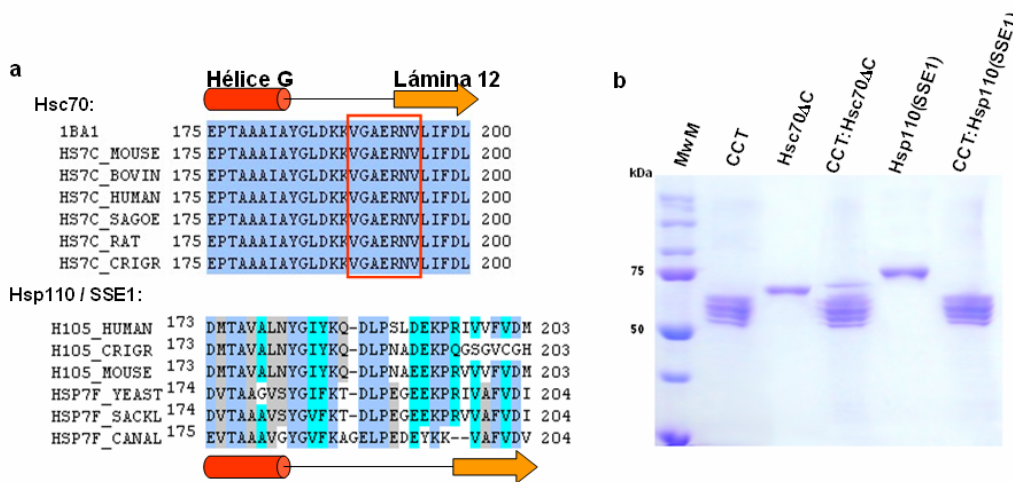


Figura 4.20: Ensayo de interacción de CCT y HSP110. (a) Alineamiento de secuencias de Hsc70 y Hsp110 centrado en el posible sitio de unión de Hsc70 a CCT. El rectángulo de color rojo destaca la conservación de secuencia que existe entre miembros de Hsc70 comparada con la heterogeneidad que existe proteínas de la familia Hsp110. (b) Ensayo de unión de CCT y Hsp110. Los pocillos de CCT, Hsc70_{AC} y Hsp110 se utilizaron como controles de movilidad. CCT:Hsc70_{AC} se utilizó como control positivo del ensayo de interacción.

Aunque la estructura del dominio ATPasa de las proteínas Hsp110 está bastante conservada en comparación al dominio ATPasa de las proteínas Hsp70, la región de Hsc70_{NBD} que parece interactuar con CCT está altamente conservada entre los miembros de la familia Hsc70 pero no así en la Hsp110. Por esta razón, se decidió realizar un ensayo de interacción entre CCT y el homólogo de Hsp110 en levaduras, SSE1 (Figura 4.20b). El resultado de este ensayo muestra que Hsp110 no interactúa con la chaperonina eucariota, lo que sugiere que la interacción que se produce entre los miembros eucariotas de Hsp70 y Hsp60 es específica de eucariotas y únicamente tiene lugar entre CCT y Hsc70/Hsp70.

4.9. Ensayo de interacción de CCT y los mutantes de Hsc70ΔC

Con el fin de confirmar la importancia de la secuencia V₁₈₉GAERNV₁₉₅ de Hsc70_{NBD} como sitio de unión a CCT se generaron dos mutantes, Hsc70ΔC₁₈₉₋₁₉₂, en el cual se cambió la región V₁₈₉GAE₁₉₂ por la secuencia correspondiente de DnaK de *E. coli* (T₁₈₅GN₁₈₇; Figura 4.18b), y Hsc70ΔC₁₈₉₋₁₉₅, donde se sustituyó toda la región involucrada en la unión con CCT (V₁₈₉GAERNV₁₉₅) por la misma secuencia de DnaK (T₁₈₅GNRTI₁₉₁; Figura 4.18b).

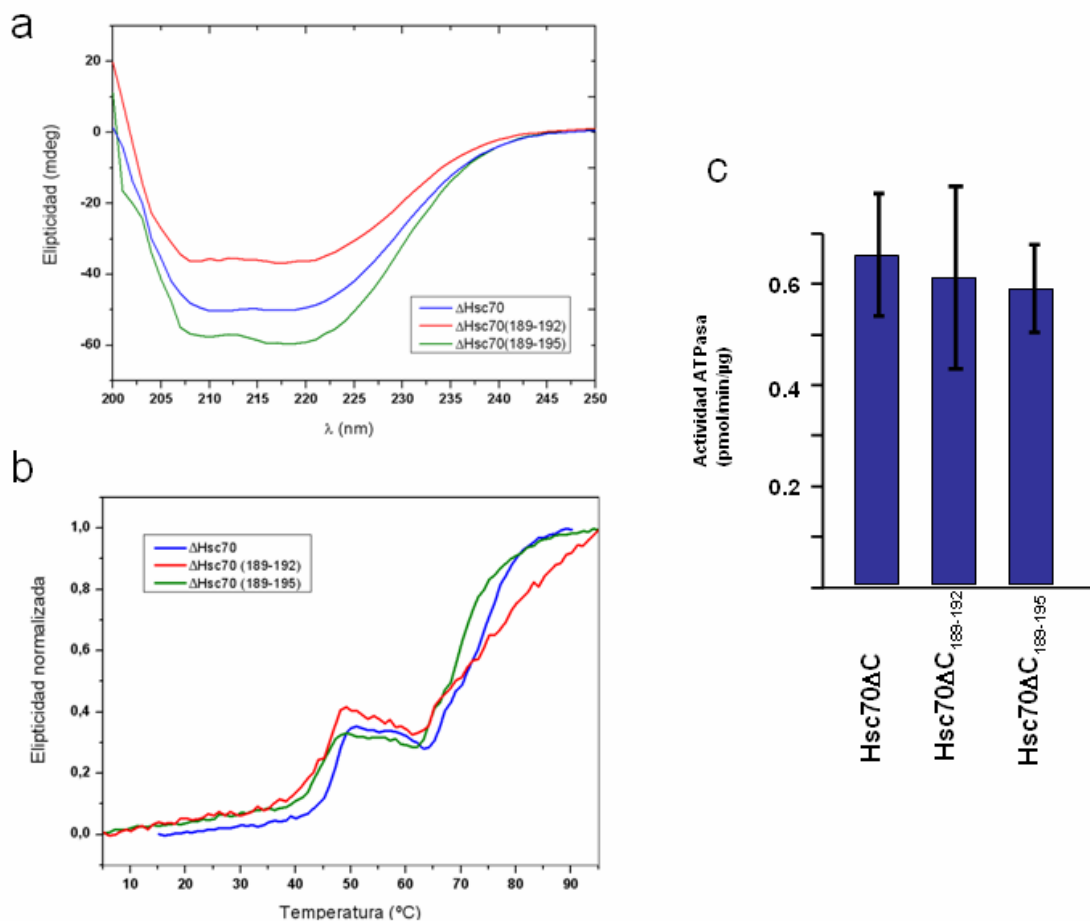


Figura 4.21: Viabilidad funcional de los mutantes de Hsc70ΔC. (a) Espectros en el UV-lejano de Hsc70ΔC y los mutantes Hsc70ΔC₁₈₉₋₁₉₂ y Hsc70ΔC₁₈₉₋₁₉₅ en tampón PBS, pH 8.5. (b) Estabilidad térmica de las mismas muestras observada mediante el cambio de elipticidad a 215 nm. (c) Actividad ATPasa de los mutantes Hsc70ΔC₁₈₉₋₁₉₂ y Hsc70ΔC₁₈₉₋₁₉₅ comparada con Hsc70ΔC. Los dos mutantes poseen una actividad ATPasa similar a la obtenida para Hsc70ΔC.

Antes de realizar los ensayos de unión a CCT se quiso comprobar que las sustituciones incorporadas a los mutantes de Hsc70 Δ C no habían afectado a la estructura secundaria de la proteína. La estructura secundaria de Hsc70 Δ C y los dos mutantes se analizó mediante dicroísmo circular. Como se muestra en la figura 4.21a, la comparación de los espectros en el UV-lejano indica que las proteínas mutantes adquieren una estructura secundaria similar a la de Hsc70 Δ C y por lo tanto las mutaciones introducidas no afectan a este nivel estructural. Para analizar si las mutaciones modifican la estabilidad térmica de estas proteínas se caracterizó la variación con la temperatura de la elipticidad a 222 nm, característica de estructuras helicoidales, en función de la temperatura (Figura 4.21b). Los mutantes Hsc70 Δ C₁₈₉₋₁₉₂ y Hsc70 Δ C₁₈₉₋₁₉₅ muestran transiciones con una amplitud semejante y a temperaturas similares a las de Hsc70 Δ C. Se producen dos transiciones, en torno a los 45 °C y 70 °C, donde la pérdida de estructura helicoidal es discontinua.

Para conocer la repercusión funcional de las sustituciones realizadas en los mutantes de Hsc70 Δ C, se estudió su capacidad de hidrolizar ATP. El ciclo de hidrólisis de ATP se considera un factor importante que modula la actividad biológica de las proteínas Hsp70 puesto que controla la transición entre los estados de alta afinidad (ADP) y baja afinidad (ATP) por sustratos (Bakau y Horwich, 1998). Como se puede observar en la figura 4.20c, la actividad ATPasa de los mutantes, Hsc70 Δ C₁₈₉₋₁₉₂ y Hsc70 Δ C₁₈₉₋₁₉₅, es similar a la de Hsc70 Δ C.

Una vez analizada la viabilidad funcional de los mutantes, se realizó un ensayo de unión a CCT con los mutantes Hsc70 Δ C₁₈₉₋₁₉₂ y Hsc70 Δ C₁₈₉₋₁₉₅ mediante geles bidimensionales (Figura 4.22a). La media de tres experimentos independientes (Figura 4.22b) muestra que Hsc70 Δ C₁₈₉₋₁₉₂ se une a CCT un 18% con respecto a Hsc70 Δ C y que Hsc70 Δ C₁₈₉₋₁₉₅ lo hace únicamente en un 6%. Este hecho indica que la secuencia V₁₈₉GAERNV₁₉₅ de Hsc70 desempeña un papel importante en la interacción con CCT.

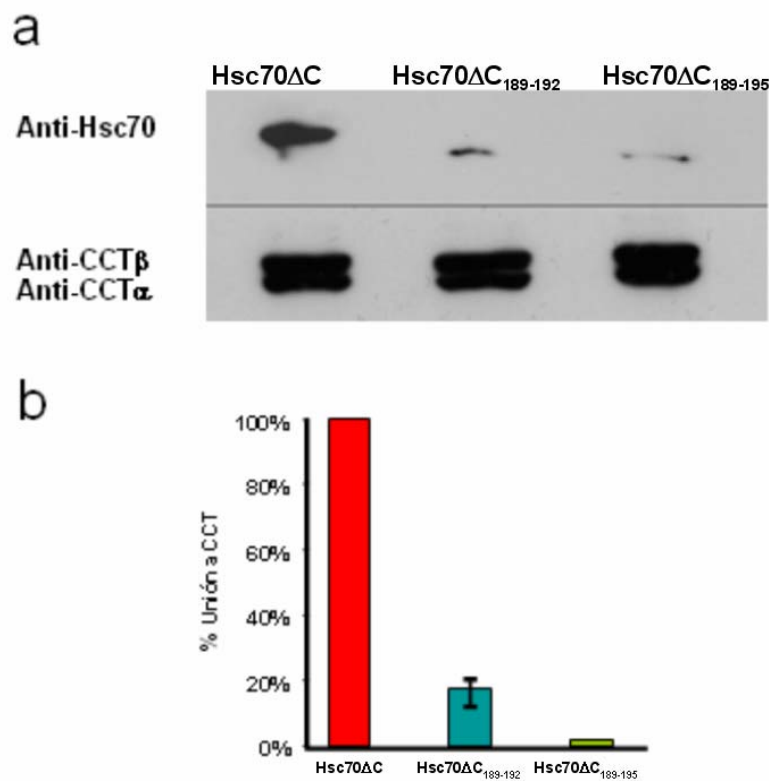


Figura 4.22: Interacción específica de CCT y Hsc70. (a) Ejemplo de ensayo de unión a CCT con Hsc70ΔC y los mutantes Hsc70ΔC₁₈₉₋₁₉₂ y Hsc70ΔC₁₈₉₋₁₉₅. La misma cantidad de CCT (véase la señal generada por los anticuerpos que reconocen CCTα y CCTβ) se incubó con cantidades idénticas de Hsc70ΔC y los mutantes. (b) Porcentajes de unión a CCT de los mutantes Hsc70ΔC₁₈₉₋₁₉₂ y Hsc70ΔC₁₈₉₋₁₉₅ comparados con Hsc70ΔC (100%). Las barras de errores corresponden a un rango de tres experimentos independientes.

4.10. Ensayo de interacción de CCT y el mutante de DnaK

De la misma manera que se realizaron los mutantes de Hsc70ΔC, se generó un mutante de DnaK, en el cual se sustituyó la secuencia T₁₈₅GNRTI₁₉₁ (Figura 4.18b) por el sitio de unión a CCT de Hsc70. El ensayo de unión a CCT (Figura 4.23) muestra que el mutante DnaK₁₈₅₋₁₉₁ se une a la chaperonina eucariota y la media de tres experimentos indica que su unión es un 64% con respecto a Hsc70ΔC. Este hecho refleja que el sitio de unión a CCT realmente está involucrado en la unión entre las dos chaperonas pero posiblemente, otra región, dominio o una determinada conformación que únicamente se da en Hsc70 sean necesarios para una correcta interacción.

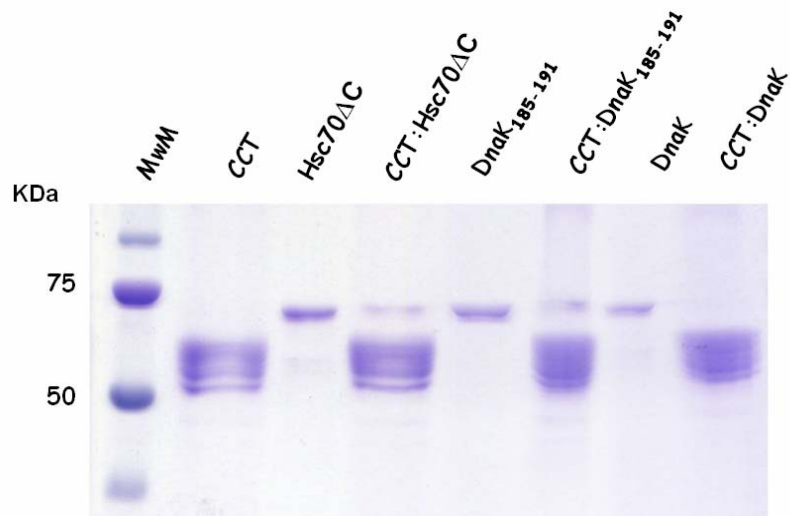
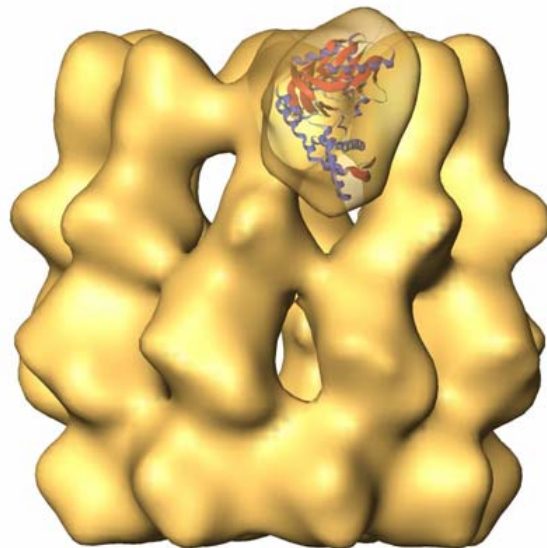


Figura 4.23: Ensayo de unión a CCT de la quimera DnaK₁₈₅₋₁₉₁ que contiene el sitio de unión de Hsc70 a CCT. Hsc70 Δ C (control positivo de la interacción), DnaK (control negativo) y la quimera DnaK₁₈₅₋₁₉₁ se incubaron con CCT y se realizó un experimento de interacción como se describe en la Fig. 4.3. Los pocillos correspondientes a Hsc70 Δ C, DnaK₁₈₅₋₁₉₁ y DnaK son controles de movilidad.

5. Discusión





6.1. Interacción específica entre los miembros eucariotas de Hsp60 y Hsp70

Dentro del amplio conjunto de chaperonas que actúa en la asistencia del plegamiento de proteínas dentro del citoplasma destaca la acción de dos tipos principales de chaperonas (hsp70 y hsp60) en un proceso encadenado estructural y funcionalmente. Este mecanismo de actuación de la maquinaria de chaperonas citosólicas se ha generalizado tanto para procariotas como eucariotas. A pesar de esto, y comparándolo con lo que ocurre en bacterias, el número y el tipo de proteínas que necesitan la asistencia de chaperonas en el citosol eucariota requiere una maquinaria más compleja y, precisa de requerimientos mucho más diversos que el sistema heredado de bacterias (Young y cols., 2004).

Uno de los objetivos más importantes de este trabajo ha sido profundizar en la naturaleza de la interacción entre las dos chaperonas más representativas del citoplasma eucariota con el fin de averiguar si en dicha interacción existe algún tipo de especificidad que la diferencie del proceso que asiste el plegamiento de proteínas en procariotas.

Los experimentos bioquímicos y estructurales realizados en esta tesis doctoral han mostrado que CCT interacciona de forma estable con los dos miembros citosólicos de la familia Hsp70 (Hsc70/Hsp70), así como con la forma truncada de Hsc70 (Hsc70 Δ C; Jiang y cols., 2005) que conserva la misma funcionalidad que la proteína silvestre. Al igual que CCT, Hsc70 está involucrada en el plegamiento de un amplio espectro de proteínas y en numerosas funciones celulares (Bukau y Horwich, 1998; Young y cols., 2003) gracias a la interacción con numerosas cochaperonas y cofactores que se unen a ésta, por uno o ambos dominios estructurales, regulando su ciclo de actividad ATPasa y los cambios conformacionales que se dan en los dos dominios funcionales (Bukau y Horwich, 1998; Mayer y Bakau, 2005). Con el fin de determinar si CCT se une por uno o ambos dominios de Hsc70, se realizó un ensayo de unión a CCT con los dos dominios funcionales de Hsc70 (Hsc70_{NBD} y Hsc70_{PBD}). El ensayo de unión a CCT mostró que el dominio estructural de Hsc70 que se une a la chaperonina es Hsc70_{NBD}. El procesamiento bidimensional de los complejos CCT:Hsc70_{NBD} a partir de microscopía

electrónica muestra a Hsc70_{NBD} interactuando por el exterior de CCT con una de sus subunidades. El análisis de inmunomicroscopía electrónica muestra, además, que dicha interacción es de carácter específico ya que Hsc70_{NBD} se une de forma clara sólo a CCT β . La naturaleza de la interacción entre CCT y Hsc70 se ha caracterizado en mayor profundidad mediante la reconstrucción tridimensional, realizada mediante criomicroscopía electrónica y procesamiento de imagen, del complejo CCT:Hsc70_{NBD}. La estructura tridimensional del complejo muestra una masa similar al tamaño del dominio ATPasa de Hsc70 interactuando con una determinada subunidad de CCT. El ajuste de la estructura atómica de Hsc70_{NBD} dentro del volumen del complejo CCT:Hsc70_{NBD} sugiere que la región comprendida entre V₁₈₉GARENV₁₉₅ del dominio ATPasa de Hsc70 es la zona involucrada en la interacción con la chaperonina.

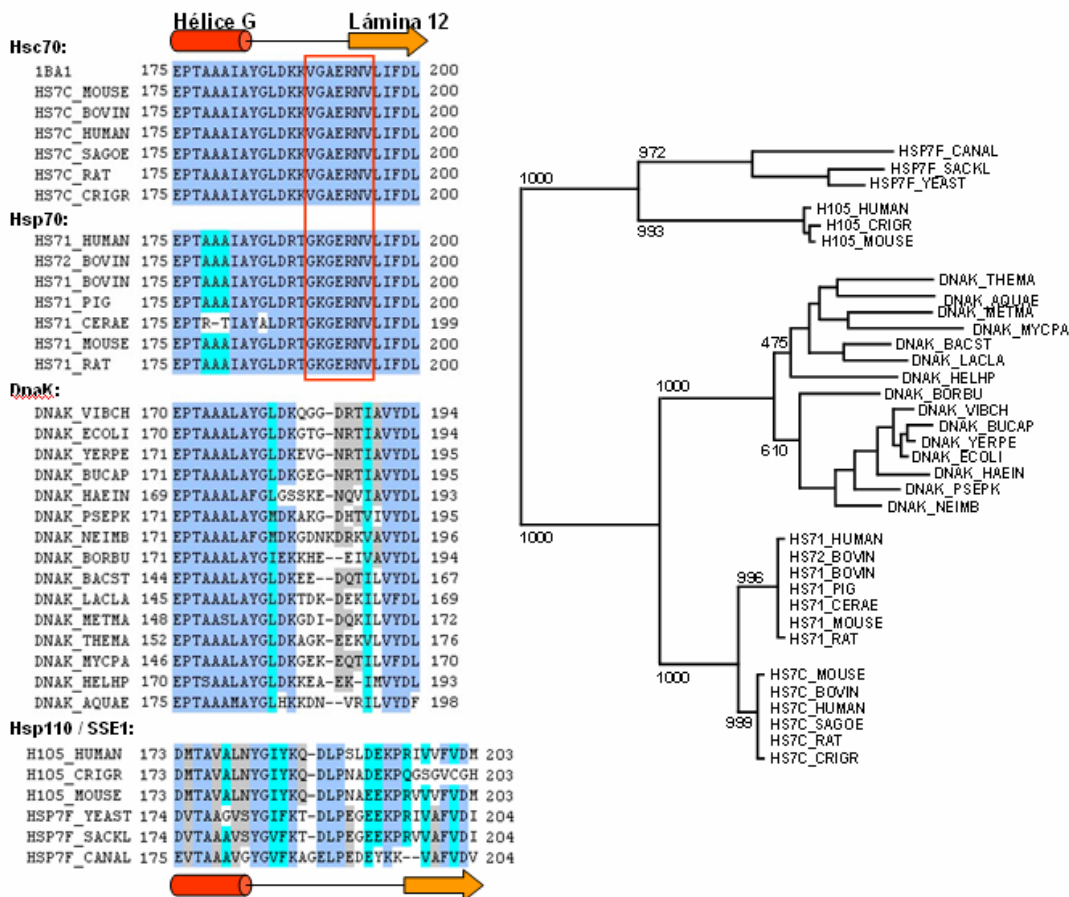


Figura 5.1: (a) Alineamiento de secuencias de proteínas pertenecientes a las familias de Hsc70/Hsp70/DnaK/Hsp110. El rectángulo coloreado en rojo muestra el sitio de unión a CCT a partir del resultado obtenido en el ajuste de la estructura atómica de Hsc70_{NBD} dentro de la masa correspondiente de la estructura tridimensional del complejo CCT:Hsc70_{NBD}. En ese mismo recuadro también se observa la conservación en secuencia que poseen Hsp70 y Hsc70. (b) Árbol filogenético que representa las relaciones evolutivas entre varias proteínas de las familias Hsc70/Hsp70/DnaK/Hsp110. Se destaca la alta conservación en secuencia que existe dentro de las familias Hsp70 y Hsc70 comparada con la heterogeneidad observada en la familia de DnaK.



El posible sitio de unión a CCT que apunta el ajuste de la estructura atómica de Hsc70_{NBD} en la estructura tridimensional del complejo CCT:Hsc70_{NBD} corresponde una secuencia que suscita un enorme interés. Se trata de una región que corresponde al bucle situado entre la hélice- α G y la hoja- β 12 y parte del extremo N-terminal de esta misma hoja- β . De forma llamativa, esta posible zona de interacción se encuentra especialmente conservada en las familias de proteínas de Hsp70/Hsc70, mientras que se observa una variabilidad mucho mayor en la misma región entre miembros de la familia de DnaK, sus correspondiente homólogos procariotas (Figura 5.1). La familia de proteínas Hsp110 muestra un estado intermedio de variabilidad de secuencia en esta misma región, existiendo una gran similitud estructural entre los dominios ATPasa de ambas familias. En este contexto, se realizaron ensayos de unión a CCT con DnaK y Hsp110 para comprobar la importancia del posible sitio de unión a CCT de Hsc70. Los experimentos bioquímicos de unión muestran que DnaK y Hsp110 no se unen a la chaperonina eucariota. Por su parte, el homólogo procariota de CCT, GroEL no interacciona con DnaK ni con su homólogo eucariota Hsc70. En definitiva, todos estos resultados sugieren que la interacción que se produce entre los dos representantes eucariotas de Hsp60 y Hsp70 es de carácter único. En este momento del trabajo se profundizó en la interacción entre Hsc70 y CCT para comprobar hasta que punto el posible sitio de unión ($V_{189}GAERNV_{195}$) está implicado en la interacción con CCT. Se generaron dos mutantes de Hsc70 a los que se les cambió, parcial (Hsc70 $\Delta C_{189-192}$) o totalmente (Hsc70 $\Delta C_{189-195}$), la secuencia de unión a CCT por la correspondiente de DnaK. La media de tres ensayos de unión a CCT muestra que el mutante Hsc70 $\Delta C_{189-192}$ se une a CCT un 18% con respecto a Hsc70 ΔC y que Hsc70 $\Delta C_{189-195}$ lo hace únicamente en un 6%. De la misma manera se generó un mutante de DnaK en el cual se le introdujo el sitio de unión a CCT. Los experimentos de unión mostraron que el mutante DnaK₁₈₅₋₁₉₁ se une a la chaperonina eucariota pero no lo hace en la misma relación que Hsc70. Este hecho indica que el sitio de unión a CCT de Hsc70 realmente está involucrado en la unión entre las dos chaperonas pero posiblemente, otra región o dominio de Hsc70 sea necesario para una correcta interacción. Todos estos resultados sugieren que las dos familias de chaperonas, Hsp60 y Hsp70, han podido evolucionar, desde un proceso de cooperación en procariotas hacia una interacción estable en



eucariotas, para hacer más eficiente el proceso de plegamiento cuando fuera necesaria la acción conjunta de las dos chaperonas.

En bacterias, GroEL reconoce y une proteínas desnaturalizadas a través de interacciones hidrófobas que se producen entre ciertos residuos hidrófobos dispuestos en los dominios apicales y los del polipéptido desnaturalizado (Horwich y cols., 2007). Esta interacción es inespecífica e involucra a las regiones desnaturalizadas y expuestas del sustrato, que pueden ser distintas en cada una de las moléculas, con una o varias subunidades de la chaperonina. De la misma manera, la unión de DnaK a sustratos es también poco selectiva. Un estudio realizado con más de 4000 librerías peptídicas demostró que el motivo de unión a sustrato de DnaK consiste en un núcleo de cinco aminoácidos preferentemente hidrofóbicos flanqueados en ambos extremos por una región de residuos con carga positiva. Este motivo se repite estadísticamente cada 40 residuos en las proteínas. Esto podría explicar la poca selectividad de DnaK a la hora de unirse a sus sustratos en un estado parcial o completamente desplegado (Rüdiger y cols., 1997).

DnaK y la chaperonina GroEL participan y colaboran en el plegamiento de un amplio rango de proteínas. DnaK no es absolutamente esencial para la viabilidad celular (Deuerling y cols., 1999; Teter y cols., 1999) pero GroEL y su cochaperona, GroES sí lo son en condiciones normales de crecimiento (Fayet y cols., 1989; Horwich y cols., 1993) y pueden compensar parcialmente la pérdida de función de DnaK (Genevaux y cols., 2004; Ullers y cols., 2004; Vorderwülbecke y cols., 2004). Se estima que el 10% de las proteínas que existen en *E. coli* interactúan con GroEL y solamente un 35% de éstas, exhiben una obligada dependencia en su plegamiento por parte de la chaperonina. Este porcentaje se ve incrementado sustancialmente en células mutantes con pérdida de función de Hsp70 y TF (Houry y cols., 1999; Kerner y cols., 2005). Los resultados publicados hasta la fecha sugieren que aunque exista una amplia maquinaria de chaperonas controlando el plegamiento de proteínas, el proceso de colaboración entre chaperonas Hsp60 y Hsp70 en organismo procariontes es bastante inespecífico y poco selectivo.



En eucariotas, CCT y Hsc70 interactúan con numerosas cochaperonas y cofactores para controlar el plegamiento de un amplio espectro de proteínas. Son varios los trabajos que ponen de manifiesto la existencia de un proceso de colaboración entre las dos chaperonas más representativas del citoplasma eucariota (Lewis y cols., 1992; Frydman y cols., 1994; Hynes y cols., 1996; Siegers y cols., 2003). Participan conjuntamente en el plegamiento de varias proteínas como VHL (Feldman y cols., 1999; Melville y cols., 2003) o en el ensamblaje de proteínas poliglutaminas (poly-Q) como oligómeros no tóxicos (Behrends y cols., 2006; Tam y cols., 2006). Un ejemplo muy evidente del proceso de colaboración entre CCT y Hsc70 es el plegamiento de grupo de proteínas del citosol de levaduras que comparten la característica en común de poseer dominios con repeticiones WD40 (Young y cols., 2004). Todas estas proteínas interactúan transitoriamente con CCT y Ssb1/2p (Hsp70 de levaduras) para alcanzar su conformación nativa (Siegers y cols., 2003). Otro ejemplo de la cooperación funcional entre CCT y Hsp70 es la formación del complejo supresor de tumores VHL. En condiciones normales, el complejo de elonginas B, C y VHL forman el complejo VBC supresor de tumores gracias a su asociación con las chaperonas Hsp70 y CCT (Feldman y cols., 1999; Melville y cols., 2003). La unión de CCT con VHL se produce, como en el caso anterior, a través de un dominio que contiene varias repeticiones del motivo WD40 (Feldman y cols., 2003). Al analizar el proceso de plegamiento en diferentes cepas de levaduras con mutaciones en los genes de Hsp70 y CCT δ , se observa que mutaciones en CCT δ no afectan la interacción de VHL con Hsp70 pero disminuye la unión a CCT. Por otra parte, mutaciones con pérdida de función en Hsp70 impiden la unión de VHL tanto a Hsp70 como CCT (Melville y cols., 2003). Todos estos resultados y los expuestos en esta tesis doctoral sugieren que mientras las chaperonas procariotas DnaK y GroEL cooperan en el plegamiento de sustratos desnaturalizados sin generar una interacción estable, sus homólogos eucariotas han evolucionado hacia un mecanismo más sofisticado donde la interacción de CCT y Hsc70, al igual que ocurre entre CCT y prefoldina para actinas y tubulinas, quedaría restringida al plegamiento de un grupo de proteínas, posiblemente proteínas con dominios WD40, que requieran la acción específica y conjunta de ambas chaperonas (Figura 5.2).

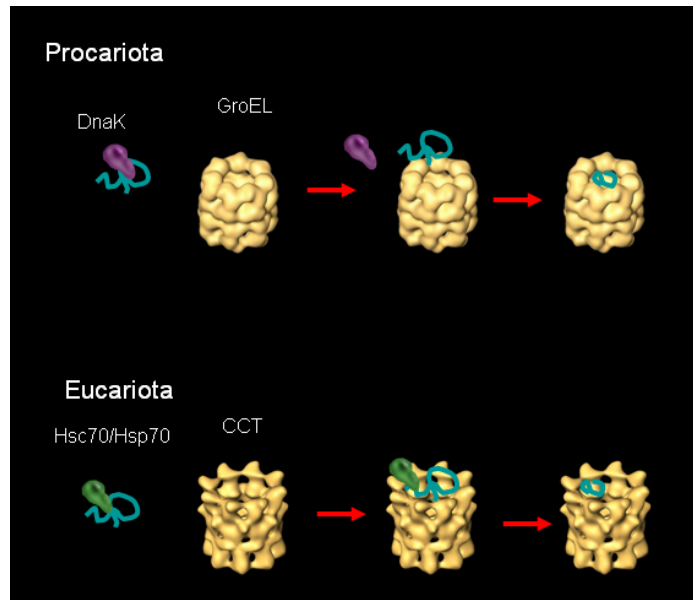


Figura 5.2: Posible mecanismo de colaboración entre chaperonas Hsp60 y Hsp70. Mientras que en los organismos Procarriotas, DnaK coopera con la chaperonina GroEL en el plegamiento de proteínas desnaturalizadas sin ningún tipo de contacto físico entre las dos chaperonas, en los Eucariotas, el sustrato unido a la chaperona Hsp70/Hsc70 interacciona con CCT y libera el sustrato al interior de la cavidad de ésta generando un proceso de plegamiento más eficiente.

6.2. Mecanismo de interacción entre CCT y Hsc70

A diferencia de lo que ocurre en las chaperoninas de tipo I donde una cochaperonina del tipo GroES facilita el encapsulamiento de los diferentes sustratos, la unión de ATP a CCT genera grandes cambios conformacionales en la hélice del dominio apical que permiten el cierre de la cavidad y el consiguiente plegamiento del sustrato (Gómez-Puertas y cols., 2004). A pesar de este hecho, al menos para las proteínas citoesqueléticas, actina y tubulina, la chaperona PFD colabora con CCT a modo de cochaperona en el proceso de plegamiento. PFD interacciona fundamentalmente con actina y tubulina facilitando su transferencia a CCT mediante un contacto físico con la chaperonina (Martín-Benito y cols., 2002). De la misma manera, PhLP1 interacciona con CCT y su unión física ha sido caracterizada por criomicroscopía electrónica (Martín-Benito y cols., 2004). PhLP1 actúa como cochaperona de CCT en el



plegamiento y/o formación del complejo $G\gamma$ transducina, el cual está implicado en procesos de señalización celular (Lukov y cols., 2005, 2006; Humrich y cols., 2005).

Tanto PFD como PhLP1 interactúan con CCT por los dominios apicales, ocluyen parcialmente la cavidad de la chaperonina y permiten a los diferentes sustratos colocarse cerca de la región de unión a sustratos, localizada en la cara interna de los dominios apicales de las subunidades de CCT (Llorca y cols., 1999, 2000; Gómez-Puertas y cols., 2004). Aunque la reconstrucción tridimensional de la interacción entre CCT y Hsc70 se realizó sólo con el Hsc70_{NBD}, el ajuste de la estructura atómica completa de Hsc70 Δ C (Jiang y cols., 2005) dentro de la reconstrucción tridimensional del complejo CCT:Hsc70_{NBD} (Figura 5.3) muestra como el Hsc70_{PBD} se podría colocar en el interior de la cavidad de CCT, cerca de la región de unión a sustratos. De esta manera, la unión a CCT del complejo Hsc70:sustrato se produciría a través del dominio Hsc70_{NBD} y permitiría a Hsc70_{PBD} colocarse cerca del sitio de unión a sustrato de CCT β o de alguna otra subunidad cercana para la posterior liberación del sustrato (Figura 5.3).

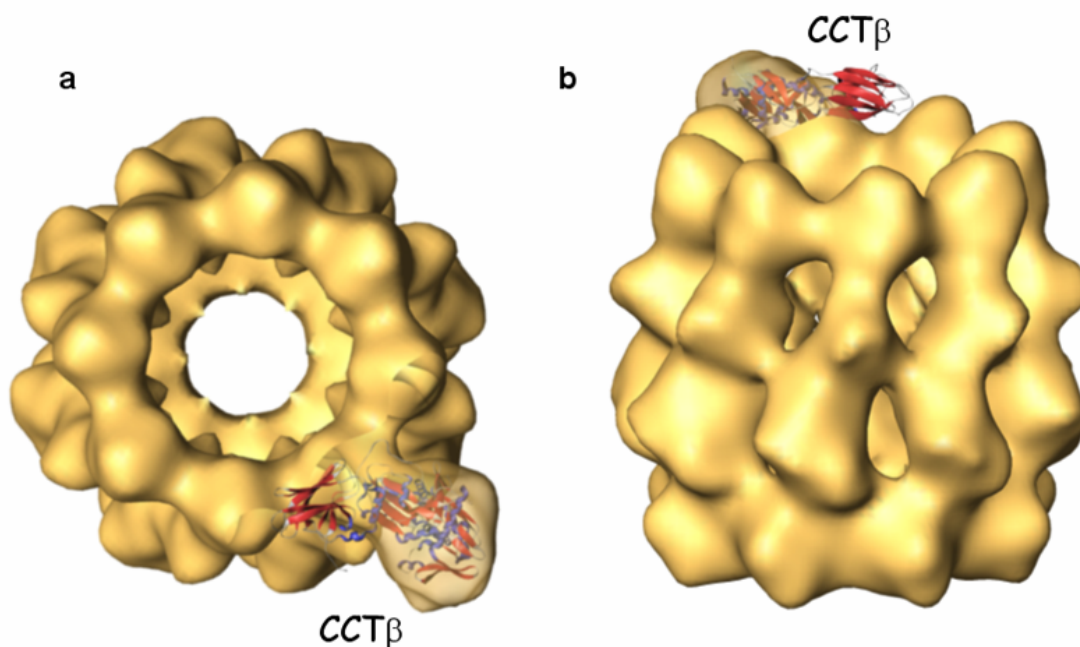
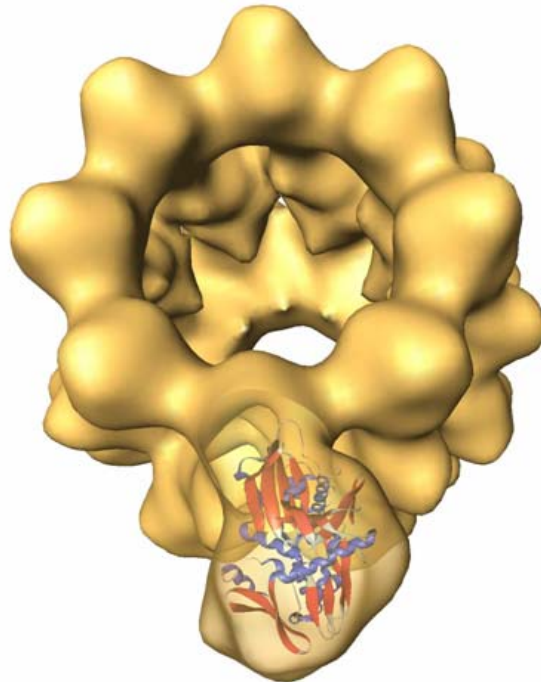


Figura 5.3: Ajuste de la estructura atómica de Hsc70 (Hsc70 Δ C; número de acceso pdb:1YUW; Jiang y cols., 2005) dentro de la reconstrucción tridimensional del complejo CCT:Hsc70_{NBD}. La vista frontal (a) y lateral (b) del complejo CCT:Hsc70_{NBD} muestran a Hsc70 interactuando por la subunidad β de CCT. Este ajuste permite observar la posición que adopta Hsc70_{PBD} en el interior de la cavidad de CCT. La barra de escala corresponde a 50 Å.



No es de extrañar que Hsc70 pudiera facilitar la liberación de determinados sustratos cerca de las subunidades CCT α y CCT δ ya que, estas dos subunidades juegan un papel determinante en el proceso de colaboración conjunta con Hsc70 en el correcto plegamiento de VHL (Spiess y cols., 2006) o en el ensamblaje de proteínas poliglutaminas (poly-Q) como oligómeros no tóxicos (Tam y cols., 2006).

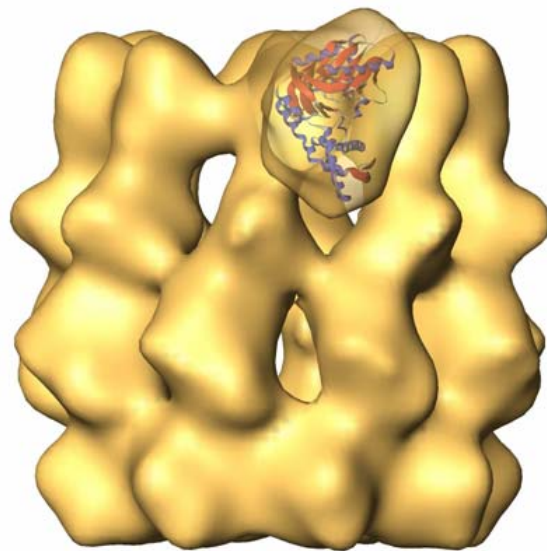
6. Conclusiones





1. Mientras que la colaboración entre miembros procariotas de las chaperonas Hsp60 y Hsp70 se produce a través de una interacción inestable, la que se produce entre CCT y Hsc70 genera un complejo estable. Esta interacción es específica y se produce entre el dominio de unión a nucleótido de Hsc70 y el dominio apical de CCT β .
2. Los resultados obtenidos sugieren un mecanismo de entrega de sustratos por parte de Hsc70 a la cavidad de CCT que supondría una mayor eficiencia en el proceso de plegamiento mediado por estas dos chaperonas.

7. Bibliografía





- * Abascal, F., Zardoya, R., y Posada, D. (2005). "ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution." *Bioinformatics* 21, p. 2104-2105.
- * Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W y Lipman, D.J. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25, p. 3389-33402.
- * Anfisen, C.B. (1973). "Principles that govern the folding of proteins chains." *Science* 181, p. 223-230.
- * Benaroudj, N., Batelier, G., Triniolles, F. y Ladjimi, M.M. (1995). "Self-association of the molecular chaperone HSC70." *Biochemistry.* 234, p.15282-15290.
- * Benaroudj, N., Fouchaq, B. y Ladjimi, M.M. (1997). "The COOH-terminal peptide binding domain is essential for self-association of the molecular chaperone HSC70." *J Biol. Chem.* 272, p. 8744-8751.
- * Behrends, C., Langer, C.A., Boteva, R., Bötcher, U.M., Stemp, M.J., Schaffar, G., Rao, B.V., Giese, A., Kretzschmar, H., Siegers, K., y Hartl, F.U. (2006). "Chaperonin TRiC Promotes the Assembly of polyQ Expansion Proteins into Nontoxic Oligomers." *Mol. Cell* 23, p. 887-897.
- * Blaauw, M., Knol, J.C., Kortholt, A., Roelofs, J., Ruchira, P., Postma, M., Visser, A.J. y van Haastert, P.J. (2003). "Phosducin-like proteins in Dictyostelium discoideum: implications for the phosducin family of proteins." *EMBO J.* 22, p. 5047-5057.
- * Blond-Elguindi, S., Cwirla, S.E, Dower, W.J, Lipshutz, R.J, Sprang, S.R, Sambrook, J.F. y Gething, M.J. (1993). "Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP." *Cell* 75, p. 717-728.
- * Bosch, G., Baumeister, W. y Essen L.O. (2000). "Crystal structure of the beta-apical domain of the thermosome reveals structural plasticity in the protrusion region." *J. Mol. Biol.* 301, p.19-25.



- * Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., y Sigler, P.B. (1994). "The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å." *Nature* 371, p. 578–586.
- * Buchberger, A., Theyssen, H., Schroder, H., McCarty, J.S., Virgallita, G, Milkereit, P., Reinstein, J. y Bukau, B. (1995). "Nucleotide-induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication." *J. Biol. Chem.* 270, p. 16903-16910.
- * Buckle, A.M., Zahn, R. y Fersht, A.R. (1997). "A structural model for GroEL-polypeptide recognition." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, p. 3571-3575.
- * Bukau, B. y Walter, C.G. (1989). "Cellular defects caused by deletion of the Escherichia coli dnaK gene indicate roles for heat shock protein in normal metabolism." *J. Bacteriol.* 171, p. 2337-2346.
- * Bukau, B. y Horwich A. L. (1998). "The hsp70, hsp60 chaperone machines." *Cell* 92, p. 351-366.
- * Bukau, B., Weissman, J. y Horwich, A. (2006). "Molecular chaperones and protein quality control." *Cell* 125, p. 443-451.
- * Camasses, A., Bogdanova, A., Shevchenko, A. y Zachariae, W. (2003). "The CCT chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional Cdc20". *Mol. Cell* 12, p. 87-100.
- * Caplan, A.J. (1999). "Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies." *Trends Cell Biol.* 9, p. 262-268.
- * Carrascosa, J.L., Llorca, O. y Valpuesta, J.M. (2001). "Structural comparison of prokaryotic and eukaryotic chaperonins." *Micron* 32, p. 43-45.
- * Chacón, P. y Wriggers, W. (2002). "Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures." *J. Mol. Biol.* 317, p. 375-384.
- * Cheetham, M.E. y Chaplan, A.J. (1998). "Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function." *Cell. Stress. Chap.* 3, p. 28-36.



- * Chou, C.C., Forouhar, F., Yeh, Y.H., Shr, H.L., Wang, C. y Hsiao, C.D. (2003). "Crystal structure of the C-terminal 10-kDa subdomain of Hsc70." *J. Biol. Chem.* 278, p. 30311-30316.
- * Cyr, D.M., Höhfeld, J. y Patterson, C. (2002). "Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold." *Trends Biochem. Sci.* 27, p. 368-375.
- * Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A., y Bukau, B. (1999). "Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins." *Nature* 400, p. 693-696.
- * Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Stetter, K.O., Huber, H., Huber, R. y Steinbacher, S. (1998). "Crystal Structure of the Thermosome, The Archeal Chaperonin and Homolog of CCT". *Cell* 93, p. 125-138.
- * Doong, H., Vrailas, A. y Kohn, E.C. (2002). "What's in the 'BAG'? A functional domain analysis of the BAG-family proteins". *Cancer Lett.* 188, p. 25-32.
- * Dragovic, Z., Broadley, S.A, Shomura, Y., Bracher, A. y Hartl, F.U. (2006). "Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s." *EMBO J.* 25, p. 2519-2528.
- * Dunn, A.Y., Melville, M.W. y Frydman, J. (2001). "Review: cellular substrates of the eukaryotic chaperonin TriC/CCT." *J. Struct. Biol.* 135, p. 176-184.
- * Ellis, R.F. (1996). "Chaperonins: introductory perspective" en Ellis, R.J. "The Chaperonins", *Academic Press*, San Diego, p. 1-25.
- Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W.A., y Hartl, F.U. (1997). "In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system." *Cell* 90, p. 491-500.
- * Fan, C.Y., Lee, S., Ren, H.Y. y Cyr, D.M. (2004). "Exchangeable chaperone modules contribute to specification of type I and type II Hsp40 cellular function." *Mol. Biol. Cell.* 2, p. 761-773.
- * Farr, G.W., Furtak, K., Rowland, M.B., Ranson, N.A., Saibil, H.R., Kirchhausen, T. y Horwich, A.L. (2000). "Multivalent binding of nonnative proteins by the chaperonin GroEL." *Cell* 100, p. 561-573.



- * Fayet, O., Ziegelhoffer, T., y Georgopoulos, C. (1989). "The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures." *J. Bacteriol.* 171, p. 1379-1385.
- * Feldman, D.E., Thulasiraman, V., Ferreyra, R.G. y Frydman J. (1999). "Formation of the VHL-Elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TriC". *Mol. Cell* 4, p. 1051-1061.
- * Feldman, D.E., Spiess, C., Howard, D.E. y Frydman, J. (2003). "Tumorigenic mutations in VHL disrupt folding in vivo by interfering with chaperonin binding". *Mol. Cell.* 12, p. 1213-1224.
- * Fenton, W.A., Kashi, Y., Furtak, K. y Horwich, A.L. (1994). "Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and released." *Nature* 371, p. 614-619.
- * Ferreyra, R.G. y Frydman, J. (2000). "Purification of the cytosolic chaperonin TRiC from bovine testis". *Methods Mol. Biol. (Chaperonins protocols)*, vol. 140, p. 153-160.
- * Fink, L.F. (1999). "Chaperone-mediated protein folding". *Physiological Reviews* 79, p. 425-449.
- * Flaherty, K.M., De Luca-Flaherty, C. y McKay, D.B. (1990). "Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein." *Nature* 346, p. 623-628.
- * Flaherty, K.M., Wilbanks, S.M., De Luca-Flaherty, C. y McKay, D.B. (1994). "Structural basis of the 70-kilodalton heat shock cognate protein ATP hydrolytic activity. II. Structure of the active site with ADP or ATP bound to wild type and mutant ATPase fragment." *J. Biol. Chem.* 269, p. 12899-12907.
- * Frank, J. (1996). "Three-dimensional reconstruction." En *Three-dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*, San Diego, CA, USA: *Academic Press*, p.182-246.



- * Frydman, J., Nimmensgem, E., Ohtsuka, K. y Hartl, F. U. (1994). "Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones". *Nature* 370, p. 111-117.
- * Gässler, S., Buchberger, A., Laufen, T., Mayer, M.P., Schröder, H., Valencia, A. y Bukau, B. (1998). "Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with the DnaJ cochaperone." *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95, 15229-15234.
- * Genevoux, P., Keppel, F., Schwager, F., Langendijk-Genevoux, P.S., Hartl, F.U. y Georgopoulos, C. (2004). "In vivo analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor." *EMBO Rep.* 5, p. 195-200.
- * Geissler, S. Siegers, K. y Schiebel, E. (1998). "A novel protein complex promoting formation of functional α - and γ -tubulin." *EMBO J.* 17, p. 952-966.
- * Giese, A., Kretzschmar, H., Siegers, K., y Hartl, F.U. (2006). "Chaperonin TRiC Promotes the Assembly of polyQ Expansion Proteins into Nontoxic Oligomers." *Mol. Cell* 23, p. 887-897.
- * Glick, B. S. (1995). "Can Hsp70 proteins act as force-generating motors?." *Cell* 80, p. 11-14.
- * Gomez-Puertas, P., Martin-Benito, J., Carrascosa, J.L., Willison, K.R. and Valpuesta, J.M. (2004). "The substrate recognition mechanisms in chaperonins". *J. Mol. Recognit.* 17, p. 85-94.
- * Guenther, M.G., Yu, J., Kao, G.D., Yen, T.J. y Lazar, A. (2002). "Assembly of the SMRT histone deacetylase 3 repression complex requires the TCP-1 ring complex." *Gen. Dev.* 16, p. 3130-3135.
- * Guindon, S. y Gascuel, O. (2003). "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." *Syst. Biol.* 52, p. 696-704.
- * Gutsche, I., Essen, L.O. y Baumeister, W. (1999). "Group II chaperonins: new TRIC(k)s and turns of a protein folding machine." *J. Mol. Biol.* 293, p. 295-312.



- * Han, W. y Christen, P. (2001). "Mutations in the interdomain linker region of DnaK abolish the chaperone action of the DnaK/DnaJ/GrpE system." *FEBS Lett.* 497, p. 55–58.
- * Handa, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J. y Tanaka, I. (1978). "Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor." *Agric. Biol. Chem.* 42, p. 523-528.
- * Hartl, F.U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding". *Nature.* 381, p. 571-579.
- * Hartl, F.U. y Hayer-Hartl, M. (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain a folded protein". *Science* 295, p. 1852-1858.
- * Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, C., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A.R., Sassi, H., Nielsen, P.A., Rasmussen, K.J., Andersen, J.R., Johansen, L.E., Hansen, L.H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B.D., Matthiesen, J., Hendrickson, R.C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M.F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C.W.V., Figey, D. y Tyers, M. (2002). "Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry". *Nature* 415, p. 180-183.
- * Höhfeld, J., Minami, Y. y Hartl, F.U. (1995). "Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle." *Cell* 83, p. 589-598.
- * Höhfeld, J., Cyr, D.M. y Patterson, C. (2001). "From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation." *EMBO R.*, 2, p. 885-890.
- * Hong, S., Choi, G., Park, S., Chung, A.S., Hunter, E. y Rhee, S.S. (2001). "Type D retrovirus Gag polyprotein interacts with the cytosolic chaperonin TriC". *J. Virol.* 75, p. 2526-2534.



- * Horovitz, A., Fridmann, Y., Kafri, G. y Yifach, O. (2001). "Review: allostery in chaperonins". *J. Struct. Biol.* 135, p. 104-114.
- * Horovitz, A. y Willison, K.R. (2005). "Allosteric regulation in chaperonins." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, p. 1-6.
- * Horwich, A.L. y Saibil, H. (1998). "The thermosome: chaperonin with a built-in lid." *Nat. Struct. Biol.* 5 p.333-336.
- * Horwich, A.L., Low, K.B., Fenton, W.A., Hirshfield, I.N., y Furtak, K. (1993). "Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL." *Cell* 74, p. 909–917.
- * Horwich, A.L., Fenton, W.A., Chapman, E. y Farr, G.W. (2007). "Two families of chaperonin: Physiology and mechanism." *Annu. Rev. Cell Dev.* 23, p. 115-145.
- * Houry, W.A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., y Hartl, F.U. (1999). "Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL." *Nature* 402, p. 147–154.
- * Houthaeve, T., Gausepohl, H., Mann, M. y Ashman, K. (1995). "Automation of micro-preparation and enzymatic cleavage of gel electrophoretically separated proteins." *FEBS Lett.* 376, p. 91-94.
- * Hunt, J. F., Weaver, A. J., Landry, S. J., Gierasch, L. y Deisenhofer, J. (1996). "The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution". *Nature* 379, p. 37-45.
- * Humrich, J., Bermel, C., Bünemann, M., Härmark, L., Frost, R., Quitterer, U. y Lohse, J. (2005). "Phosducin-like protein regulates G-protein $\beta\gamma$ folding by interaction with tailless complex polypeptide-1 α ." *J. Biol. Chem.* 280, p. 20042-20050.
- * Hynes, G., Kubota, H. y Willison, K.R. (1995). "Antibody characterization of two distinct conformations of the chaperonin containing TCP-1 from mouse testis." *FEBS Lett.* 358, p. 129–132.
- * Hynes, G., Sutton, C.W. y Willison, K.R. (1996). "Peptide mass fingerprinting of chaperonincontaining TCP-1 (CCT) and copurifying proteins." *FASEB J.* 10, p. 137-147.



- * Hynes, G.M., y Willison, K.R. (2000). "Individual subunits of the chaperonin containing TCP-1 (CCT) mediate interactions with binding sites located on subdomains of β -actin." *J. Biol. Chem.* 275, p. 18985-18994.
- * James, P., Pfund, C. y Craig, E.A. (1997). "Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones." *Science* 275, p. 387-389.
- * Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E.M. y Sousa, R. (2005). "Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone." *Mol Cell.* 20, p. 513-524.
- * Johnson, B.D., Schumacher, R.J., Ross, E.D. y Toft, D.O. (1999). "Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding". *J. Mol. Biol.* 273, p. 3679-3686.
- * Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F. y Holmes, K.C. (1990) "Atomic structure of the actin: DNase I complex." *Nature.* 347, p. 37-44.
- * Kafri, G. y Horovitz, A. (2003). "Transient kinetic análisis of ATP-induced allosteric transitions in the eukariotyc chaperonin containing TCP-1." *J. Mol. Biol.* 326, p. 981-987.
- * Karlin, S. y Brocchieri, L. (1998). "Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution," *J. Mol. Evol.* 47, p. 565-577.
- * Karzai, A.W. y McMacken, R. (1996). "A bipartite signaling mechanism envolved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein." *J. Biol. Chem.* 271, p. 11236-11246.
- * Kashub, E., Pokrovskaja, K., Klein, G. y Szekely, L. (1999). "Epstein-Barr virus-encoded nuclear protein EBNA-3 interacts with the epsilon-subunit of the T-complex protein 1 chaperonin complex". *J. Hum. Virol.* 2, p. 33-37.
- * Kerner, M.J., Naylor, D.J., Ishihama, Y., Maier, T., Chang, H.C., Stines, A.P., Georgopoulos, C., Frishman, D., Hayer-Hartl, M., Mann, M. y Hartl, F.U. (2005). "Proteome-wide Analysis of Chaperonin-Dependent Protein Folding in Escherichia coli." *Cell* 122, p. 209-220.



- * Kim, S., Willison, K.R. y Horwich, A.L. (1994). "Cytosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains". *Trends Biochem. Sci.* 19, p. 543-548.
- * Kitamura, A., Kubota, H., Pack, C.G., Matsumoto, G., Hirayama, S., Takahashi, Y., Kimura, H., Kinjo, M., Morimoto, R. y Nagata, K. (2006). "Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state." *Nat. Cell. Biol.* 8, p. 1163-1169.
- * Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. y Jentsch, S. (1999). "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, p. 635-644.
- * Klumpp, M., Baumeister, W. y Essen L.O. (1997). "Structure of the substrate binding domain of the thermosome, an archaeal group II chaperonin." *Cell.* 91, p. 263-270.
- * Kubota, H., Hynes, G. M., Kerr, G. M. y Willison, K. (1997). "Tissue-specific subunit of the mouse cytosolic chaperonin-containing TCP-1". *FEBS Lett.* 402, p. 53-56.
- * Kubota, S., Kubota, H. y Nagata, K. (2006). "Cytosolic chaperonin protects folding intermediates of Gbeta from aggregation by recognizing hydrophobic beta-strands". *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 103, p. 8360-8365.
- * Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227, p. 680-685.
- * Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., y Finch, J.T. (1978). "Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA." *Nature* 275, p. 416-420.
- * Laufen, T., Mayer, M.P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J. y Bukau, B. (1999). "Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, p. 5452-5457.
- * Lewis, V.A., Hynes, G.M., Zheng, D, Saibil, H. y Willison, K. (1992). "T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eukaryotic cytosol." *Nature* 358, p. 249-252.



- * Lin, P. y Sherman, F. (1997). "The unique hetero-oligomeric nature of the subunits in the catalytic cooperativity of the yeast Cct chaperonin complex." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, p. 10780–10785
- * Lingappa, J.R., Martin, R.L., Wong, M.L., Ganem, D., Welch, W.J. y Lingappa, V.R. (1994). "A eukaryotic cytosolic chaperonin is associated with a high molecular weight intermediate in the assembly of hepatitis B virus capsid, a multimeric particle." *EMBO J.* 125, p. 99-111.
- * Liou, A.K.F. y Willison, K.R. (1997). "Elucidation of the subunit orientation in CCT (chaperonin containing TCP1) from the subunit composition of micro-complexes." *EMBO J.* 16, p. 4311-4316.
- * Liu, X., Lin, C.Y., Lei, M., Yan, S., Zhou, T. and Erikson, R.L. (2005). "CCT chaperonin complex is required for the biogenesis of functional Plk1" *Mol. Cell Biol.* 12, p. 4993-5010.
- * Llorca, O., Marco, S., Carrascosa, J.L. y Valpuesta, J.M. (1997). "Conformational changes in the GroEL oligomer during the functional cycle." *J. Struct. Biol.* 118, p. 31-42.
- * Llorca, O., Smyth, M.G., Carrascosa, J.L., Willison, K.R., Radermacher, M., Steinbacher, S. y Valpuesta, J.M. (1999a). "3D reconstruction of the ATP-bound form of CCT reveals the asymmetric folding conformation of a type II chaperonin". *Nature Struct. Biol.*, 6, p. 639-642
- * Llorca, O., McCormack, E.A., Hynes, G.M., Grantham, J., Cordell, J., Carrascosa, J.L., Willison, K.R., Fernandez, J.J. y Valpuesta, J.M. (1999b). "Eukaryotic type II chaperonin CCT interacts with actin through specific subunits". *Nature.* 402, p. 693-696.
- * Llorca, O., Martín-Benito, J., Ritco-Vonsovici, M., Grantham, J., Hynes, G.M., Willison, K.R., Carrascosa, J.L. y Valpuesta, J.M. (2000). "Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations". *EMBO J.* 19, p. 5971-5979.



- * Llorca, O., Martin-Benito, J., Grantham, J., Ritco-Vonsovici, M., Willison, K.R., Carrascosa, J.L. y Valpuesta, J.M. (2001). "The sequential allosteric ring mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin". *EMBO J.* 20, p. 4065-4075.
- * Ludtke S.J., Baldwin P.R. y Chiu, W. (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J. Struct. Biol.* 128, p. 12882–12897.
- * Lukov, G.L., Hu, T., McLaughlin, J.N., Hamm, H.E. y Willardson, B.M. (2005). "Phosducin-like protein acts as a molecular chaperone for G-protein betagamma dimer assembly." *EMBO J.*, 24, p. 1965-1975.
- * Lukov, G.L., Baker, C.M., Ludtke, P.J., Hu, T., Carte, M.D., Hackett, R.A., Thulin, C.D. y Willardson, B.M. (2006). "Mechanism of assembly of G protein betagamma subunits by protein kinase CK2-phosphorylated phosducin-like protein and cytosolic chaperonin complex". *J. Biol. Chem.* 281, p. 22261-22274.
- * Lundin, V.F., Stirling, P.C., Gomez-Reino, J., Mwenifumbo, J.C., Obst, J.M., Valpuesta, J.M. y Leroux, M.R. (2004). "Molecular clamp mechanism of substrate binding by hydrophobic coiled-coil residues of the archaeal chaperone prefoldin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, p.4367-4372.
- * Ma, Y. y Hendershot, L.M. (2001). "The unfolding tale of the unfolded protein response". *Cell* 107, p. 827-830.
- * Martin, J. y Hartl, F.U. (1997). "Chaperone-assisted protein folding." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, p. 41-52.
- * Martin-Benito, J., Boskovic, J., Gomez-Puertas, P., Carrascosa, J.L., Simona, C.T., Lewis, S.A., Bortolini, F., Cowan, N.J. y Valpuesta, J.M. (2002). "Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT". *EMBO J.* 21, p. 6377-6386.
- * Martin-Benito, J., Bertrand, S., Hu, T., Ludtke, P.J., McLaughlin, J.N., Willardson, B.M., Carrascosa, J.L. y Valpuesta, J.M. (2004). "Structure of the complex between the cytosolic chaperonin CCT and phosducin-like protein". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, p. 17410-17415.



- * Martín-Benito, J. Gómez-Reino, J., Stirling, P.C., Lundin, V.F., Gómez-Puertas, P., Boskovic, J., Chacón, P., Fernández, J.J., Berenguer, J., Leroux, M.R. y Valpuesta, J.M. (2007). "Divergent substrate-binding mechanisms reveal an evolutionary specialization of eukaryotic prefoldin compared to its archaeal counterpart." *Structure* 15, p. 101-110.
- * Mayer, M. P., Laufen, T., Paal, K., McCarty, J. S. y Bukau, B. (1999). "Investigation of the interaction between DnaK and DnaJ by surface plasmon resonance spectroscopy." *J. Mol. Biol.* 289, p. 1131–1144.
- * Mayer, M.P. y Bukau, B. (2005). "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism." *Cell Mol. Life Sci.* 62, p. 670-684.
- * McLaughlin, J.N., Thulin, C.D., Hart, S.J., Resing, K.A., Ahn, N.G. y Willardson, B.M. (2002). "Regulatory interaction of phosphucin-like protein with the cytosolic chaperonin complex". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, p. 7962-7967.
- * Melville, M.W., McClellan, A.J., Meyer, A.S., Darvean, A. y Frydman, J. (2003). "The Hsp70 and TRiC/CCT chaperone systems cooperate in vivo to assemble the von Hippel-Lindau tumor suppressor complex". *Mol. Cell Biol.* 23, p. 3141-3151.
- * Montgomery, D., Jordan, R., McMacken, R. y Freire, E. (1993). "Thermodynamic and structural analysis of the folding/unfolding transitions of Escherichia coli molecular chaperone DnaK." *Mol. Biol.* 232, p. 680-692.
- * Morshauer, R.C., Hu, W., Wang, H., Pang, Y., Flynn, G.C. y Zuiderweg, E.R. (1999). "High-resolution solution structure of the 18 kDa substrate-binding domain of the mammalian chaperone protein Hsc70." *J. Mol. Biol.* 289, p. 1387–1403.
- * Nitsch, M., Walz, J., Typke, D., Klumpp, M., Essen, L.O. y Baumeister, W. (1998). "Group II chaperonin in an open conformation examined by electron tomography". *Nature Struct. Biol.* 5, p. 855-857.
- * Nogales, E., Wolf, S.G. y Downing, K.H. (1998). "Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography." *Nature*. 391, p. 199-203.



- * Norcum, M.T. (1996). "Novel isolation method and structural stability of a eukaryotic chaperonin: the TCP-1 ring complex from rabbit reticulocytes". *Protein Sci.* 5, p.1366-1375.
- * Notredame, C., Higgins, D.G. y Heringa, J. (2000). "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." *J. Mol. Biol.* 302, p. 205-217.
- * Packschies, L., Theyseen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Godoy, R.S. y Reinstein, J. (1997). "GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism." *Biochemistry* 36, p. 3417-3422.
- * Pappenberger, G., Wilsher, J.A., Roe, S.M., Counsell, D.J., Willison, K.R. y Pearl, L.H. (2002). "Crystal structure of the CCTgamma apical domain: implications for substrate binding to the eukaryotic cytosolic chaperonin". *J. Mol. Biol.* 318, p. 1367-1379.
- * Pascual-Montano, A., Donate, L.E., Valle, M., Barcena, M., Pascual-Marqui, R.D. y Carazo, J.M. (2001). "A novel neural network technique for analysis and classification of EM single-particle images." *J. Struct. Biol.* 133, p. 233-245.
- * Penczek, P., Radermacher, M. y Frank, J. (1992). "Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice." *Ultramicroscopy* 40, p. 33-53.
- * Quate-Randall, E. y Joachimiak, A. (1999). "Purification of chaperonins." *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 722, p. 153-177.
- * Raviol, H., Sadlish, H., Rodríguez, F., Mayer, M.P. y Bukau, B. (2006). "Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor." *EMBO J.* 25, p. 2510-2518.
- * Revington, M., Zhang, Y., Yip, G.N., Kurochkin, A.V. y Zuiderweg, E.R. (2005). "NMR investigations of allosteric processes in a two-domain *Thermus thermophilus* Hsp70 molecular chaperone." *J. Mol. Biol.* 349, p. 163-183.
- * Ritco-Vonsovici, M. y Willison, K.R. (2000). "Defining the Eukaryotic Cytosolic Chaperonin-binding sites in human tubulins." *J. Mol. Biol.* 304, p. 81-98.



- * Rivenzon-Segal, D. Wolf, S.G., Shimon, L., Willison, K.R. and Horovitz, A. (2005). "Sequential ATP-induced allosteric transitions of the cytoplasmic chaperonin containing TCP-1 revealed by EM analysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, p. 233-237.
- * Rommelaere, H., De Neve, M., Melki, R., Vandekerckhove, J. y Ampe, C. (1999). "The cytosolic class II chaperonin CCT recognizes delineated hydrofobic sequences in its target proteins." *Biochemistry* 38, p. 3246-3257.
- * Roseman, A.M., Chen, S., White, H., Braig, K. y Saibil, H.R. (1996). "The chaperonin ATPase cycle: Mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL". *Cell* 87, p. 241-251.
- * Rothman, J.E. y Schmid, S. (1986). "Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles". *Cell* 46, p. 5-9.
- * Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., y Bukau, B. (1997). "Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries." *EMBO J.* 16, p. 1501-1507.
- * Scheres, S. H. W., Valle, M., Núñez, R., Sorzano, C. O. S., Marabini, R., Herman, G. T. y Carazo, J. M. (2005). "Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images". *J. Mol. Biol.* 348, p. 139-149.
- * Scheres, S.H.W., Gao, H., Valle, M., Herman, G.T., Eggermont, P.P.B., Frank, J. y Carazo, J.M. (2007). "Disentangling Conformational States of Macromolecules in 3D-EM through Likelihood Optimization." *Nat. Methods* 4, p. 27-29.
- * Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U. y Moarefi, I. (2000). "Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine." *Cell* 101, p. 199-210.
- * Schevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels." *Anal. Chem.* 68, p. 850-858,.



- * Schmid, D., Baici, A., Gehring, H. y Christen, P. (1994). "Kinetics of molecular chaperone action." *Science* 263, p. 971–973.
- * Sehorn, M.G., Slepnev, S.V. y Witt, S.N. (2002). "Characterization of two partially unfolded intermediates of the molecular chaperone DnaK at low pH." *Biochemistry* 41, p. 8499-8507.
- * Shaner, L., Sousa, R. y Morano, K.A. (2006). "Characterization of Hsp70 binding and nucleotide exchange by the yeast Hsp110 chaperone Sse1." *Biochemistry* 45, p. 15075-15084.
- * Shomura, Y., Yoshida, T., Iizuka, R., Maruyama, T., Yohda, M. y Miki, K. (2004). "Crystal Structures of the Group II Chaperonin from *Thermococcus* strain KS-1: Steric Hindrance by the Substituted Amino Acid, and Inter-subunit Rearrangement between Two Crystal Forms." *J. Mol. Biol.* 335, p. 1265-1278.
- * Shomura, Y., Dragovic, Z., Chang, H.C., Tzvetkov, N., Young, J.C., Brodsky, J.L., Guerriero, V., Hartl, F.U. y Bracher, A. (2005). "Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange." *Mol. Cell* 17, 367-379.
- * Siegers, K., Bolter, B., Schwarz, J.P., Bottcher, U.M., Guha, S. y Hartl, F.U. (2003). "TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes". *EMBO J.* 22, p. 5230-5240.
- * Siegert, R., Leroux, M.R., Scheufler, C., Hartl, F.U. y Moarefi, I. (2000). "Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins." *Cell* 103, p. 621-632.
- * Smith, T. F., Gaitatzes, K.S. y Neer, J. (1999). "The WD repeat: a common architecture for diverse functions". *Trends Biol. Sci.* 24, p. 181-185.
- * Sondermann, H., Scheufler, C., Scheider, C., Hohfeld, J., Hartl, F.U. y Moarefi, I. (2001). "Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors". *Science* 291, p.1553-1557.



- * Sorzano, C.O.S., Marabini, R., Velázquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J.R., Scheres, S.H.W., Carazo, J.M. y Pascual-Montano, A. (2004). "XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for Electron Microscopy." *J. Struct. Biol.* 148, p. 194-204.
- * Spiess, C., Miller, E.J., McClellan, A.M. y Frydman, J. (2006). "Identification of the TRiC/CCT substrate binding sites uncovers the function of subunit diversity in eukaryotic chaperonins." *Mol. Cell* 24, p. 25-37.
- * Srikakulam, R. y Winkelman, D.A. (1999). "Myosin II folding is mediated by a molecular chaperonin". *J. Biol. Chem.* 274, p. 27265-27273.
- * Sriram, M., Osipuk, J., Freeman, C., Morimoto, R.I. y Joachimiak, A. (1997). "Human Hsp70 binds two calcium ions within the ATPase domain." *Structure* 5, p. 403-414.
- * Steinbacher, S. y Ditzel, L. (2001). "Review: nucleotide binding to the thermoplasma thermosome: implications for the functional cycle of group II chaperonins." *J. Struct. Biol.* 135, p.147-156.
- * Sternlicht, H., Farr, G.W., Sternlicht, M.L., Driscoll, J.K., Willison, K. y Yaffe, M.B. (1993). "The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90, p. 9422-9426.
- * Stirling, P.C., Cuellar, J., Alfaro, G.A., El Khadali, F. Bech, C.T., Valpuesta, J.M., Melki, R. y Leroux, M.R. (2006). "PHLP3 modulates CCT-mediated actin and tubulin folding via ternary complexes with substrates". *J. Biol. Chem.* 281, p. 7012-7021.
- * Stirling, P.C., Srayko, M., Takhar, K., Pozniakovsky, A., Hyman, A. y Leroux, M. "Functional interaction between phosphducin-like protein 2 and cytosolic chaperonin is essential for cytoskeletal protein function and cell cycle progression." *Mol. Biol. Cell* 18, p. 2336-2345.
- * Suh, W.C., Burkholder, W.F., Lu, C.Z., Zhao, X., Gottesman, M.E. y Gross C.A. (1998). "Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, p. 15223-15228.



- * Swain, J.F., Dinler, G., Sivendran, R., Montgomery, D.L., Stoz, M. y Gierasch, L.M. (2007). "Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker." *Mol. Cell* 26, p. 27-39.
- * Swain, J.F., Schulz, E.G. y Gierasch, L.M. (2006). "Direct comparison of a stable isolated Hsp70 substrate-binding domain in the empty and substrate-bound states." *J. Biol. Chem.* 281, p. 1605–1611.
- * Takayama, S. y Reed, J.C. (2001) "Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins." *Nat. Cell Biol.* 3, p. 237-241.
- * Takayama, S., Bimston, D.N., Matsuzawa, S., Freeman, B.C., Aime-Sempe, C., Xie, Z. Morimoto, R.I., y Reed, J.C. (1997). "BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70." *EMBO J.* 16, p. 4887-4896.
- * Tam, S., Geller, R., Spiess, C. y Frydman, J. (2006). "The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions." *Nat. Cell Biol.* 8, p.1155-1162.
- * Teter, S.A., Houry, W.A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C. y Hartl, F.U. (1999). "Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains." *Cell* 97, p 755-765.
- * Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res.* 22, p. 4673-4680.
- * Thulasiraman, V., Yang, C.F. y Frydman, J. (1999). "In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment". *EMBO J.* 18, p. 85-95.
- * Ullers, R.S., Luirink, J., Harms, N., Schwager, F., Georgopoulos, C., y Genevaux, P. (2004). "SecB is a bona fide generalized chaperone in Escherichia coli." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, p. 7583–7588.

- * Ungewickell, E., Ungewickell, H. y Holstein, S.E. (1997). "Functional interaction of the auxilin J domain with the nucleotide and substrate binding modules of Hsc70." *J. Biol. Chem.* 272, p. 19594-19600.
- * Unser, M., Trus, B.L. y Steven, A.C. (1987). "A new resolution criterion based on spectral signal-to-noise ratios." *Ultramicroscopy* 23, p. 39-51.
- * Vainberg, I.E., Lewis, S.A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H.L. y Cowan, N.J. (1998). "Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin." *Cell* 93, p. 863-873.
- * Valpuesta, J.M., Martin-Benito, J., Gomez-Puertas, P., Carrascosa, J.L. y Willison, K.R. (2002). "Structure and function of a protein holding machina: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT". *FEBS Lett.* 529, p. 11-16.
- * Van den Berg, B., Wain, R., Dobson, C.M. y Ellis, R.J. (1999). "Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell". *EMBO J.* 19, p. 3870-3875.
- * Velten, M., Gomez-Vrielynck, N. Chaffotte, A. y Ladjimi, M.M. (2002). "Domain structure of the HSC70 cochaperone, HIP." *J. Biol. Chem.* 277, p. 259-266.
- * Velten, M., Villoutreix, B.O. y Ladjimi, M.M. (2000). "Quaternary structure of the HSC70 cochaperone HIP." *Biochemistry* 39, p.307-315.
- * Vogel, M., Mayer, M.P. y Bukau, B. (2006). "Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker." *J. Biol.Chem.* 281, p. 38705–38711.
- * Vorderwülbecke, S., Kramer, G., Merz, F., Kurz, T.A., Rauch, T., Zachmann-Brand, B., Bukau, B., y Deuerling, E. (2004). "Low temperature or GroEL/ES overproduction permits growth of Escherichia coli cells lacking trigger factor and DnaK." *FEBS Lett.* 559, p.181-189.
- * Wang, H., Kurochkin, A.V., Pang, Y., Hu, W., Flynn, G.C. y Zuiderweg, E.R. (1998). "NMR solution structure of the 21 kDa chaperone protein DnaK substrate binding domain: a preview of chaperone-protein interactions." *Biochemistry* 37, p. 7929–7940.

- * Wang, T.F., Chang, J.H. y Wang, C. (1993). "Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding." *J. Biol. Chem.* 268, p. 26049-26051.
- * Wei, J., Gaut, J.R. y Hendershot, L.M. (1995). "In Vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis." *J. Biol. Chem.* 270, p. 26677-26682.
- * Wilbanks, S.M., Chen, L., Tsuruta, H., Hodgson, K.O. y McKay, D.B. (1995). "Solution small-angle X-ray scattering study of the molecular chaperone Hsc70 and its subfragments." *Biochemistry* 34, p. 12095-12105.
- * Willardson, B.M. y Howlett, A.(2007). "Function of phosphoinositide-like proteins in G protein signalling and chaperone-assisted protein folding." *Cell. Sign.* En prensa.
- * Willison, K.R. y Grantham, J. (2001). "Molecular chaperones: Frontiers in Molecular Biology" en Lund, P., (Ed.) p. 90-118, *Oxford University Press*, Oxford.
- * Willison, K.R. (1999). "Composition and function of the eukaryotic cytosolic chaperonin-containing TCP-1". en Bukau, B. (Ed.), *Molecular Chaperones and Folding Catalysis*. P. 555-571, *Harwood Academic*, Amsterdam.
- * Won, K.A., Schumacher, R.J., Farr, G.W., Horwich, A.L. y Reed, S.I. (1998). "Maturation of Human Cyclin E Requires the Function of Eukaryotic Chaperonin CCT". *Mol. Cell. Biol.* 18, p. 7584-7589.
- * Xu Z, Horwich A.L y Sigler, P.B. (1997). "The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex." *Nature* 388, p. 741-750.
- * Yang, J.T., Wu, C.S.C. y Martinez, H.M. (1986). "Calculation of protein conformation from circular dichroism." *Methods Enzymol.* 130, p. 208-269.
- * Young, J.C., Barral, J.M. y Hartl, F.U. (2003). "More than folding: localized functions of cytosolic chaperones." *Trends Biochem. Sci.* 28, p. 541-547.
- * Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K. y Hartl, F.U. (2004). "Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, p. 781-791.

* Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E. y Hendrickson, W.A. (1996). "Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK." *Science* 272, p. 1606–1614.