



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

CLONAJE Y EXPRESIÓN DE MUTANTES DE Apg2

Alumno/a: *Sandín García, Daniel*

Fecha: Junio 2014

Director/a
Dr. Fernando Moro Pérez

Curso Académico
2013/14

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CHAPERONAS.....	1
1.1.1. HSP70	1
1.1.2. HSP40 (PROTEÍNAS J).....	3
1.1.3. HSP110 (APG2).....	6
1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1. PLÁSMIDOS, OLIGONUCLEÓTIDOS Y ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	9
2.2. PCR	10
2.3. MEDIOS DE CULTIVO Y CEPAS CELULARES	11
2.4. PURIFICACIÓN DE DNA	11
2.5. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO	12
2.6. ELECTROFORESIS DE DNA Y PROTEÍNAS.....	13
2.6.1. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA	13
2.6.2. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.....	14
3. RESULTADOS.....	15
3.1. ESTRATEGIA DE CLONAJE.....	15
3.2. PCR DE LAS DISTINTAS SECUENCIAS DE APG-2	17
3.3. PURIFICACIÓN DEL DNA OBTENIDO EN LAS PCRS.....	19
3.4. DIGESTIÓN DE LOS FRAGMENTOS Y EL PLÁSMIDO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	19
3.5. LIGACIÓN DE LOS INSERTOS EN EL PLÁSMIDO	20
3.6. CLONAJE DE LOS INSERTOS MEDIANTE TRANSFORMACIÓN EN DH5 α	21
3.7. MINIPREPS PARA LA EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO DE DH5 α	22
3.8. ENSAYO DE SOBREENPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS	24

4. DISCUSIÓN	26
4.1. PERSPECTIVAS.....	27
5. BIBLIOGRAFÍA.....	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CHAPERONAS

Las chaperonas, también conocidas como proteínas de choque térmico (“Heat shock proteins, Hsp”) componen una amplia familia de proteínas que participan en una gran variedad de procesos biológicos, dentro de las cuales los más importantes son la modulación del plegamiento de polipéptidos en condiciones fisiológicas, de su degradación y translocación a través de membranas y de las interacciones entre proteínas (Hartl et al., 2011; Bukau et al. 2006; Nishikawa et al., 2005). Son también importantes por la capacidad que tienen de proteger al conjunto de proteínas de la célula en situaciones de estrés (térmico, oxidativo, osmótico, etc.). Algunas chaperonas son capaces de disolver agregados de proteínas que puedan producirse en situaciones de estrés severo, y forzar su plegamiento de para recuperar su conformación nativa. Esta función es necesaria ya que en estas situaciones, la aparición de conformaciones erróneas de las proteínas y la formación de agregados pueden dar lugar a enfermedades y envejecimiento celular.

Las chaperonas pueden encontrarse en cualquier zona, ya sea en el citoplasma, retículo endoplasmático (ER), núcleo, etc. Se dividen en varios grupos dependiendo de características como su función o el tamaño. Los grupos sobre los que se centra en este trabajo son: Hsp70, Hsp40 y Hsp110.

1.1.1. Hsp70

Las Hsp70 desarrollan principalmente la función de plegamiento de proteínas (Young, 2010). Esta familia de chaperonas está muy conservada evolutivamente. Son las que llevan a cabo el reconocimiento de las proteínas que no se han plegado correctamente y hacen que recuperen su estructura nativa, además de participar en la solubilización de agregados proteicos, con la colaboración de chaperonas tanto de la familia Hsp100 en levaduras, hongos y bacterias como de las Hsp 110 en humanos. Son proteínas que necesitan la unión de ATP para llevar a cabo dicho proceso. Que puedan reconocer tanto polipéptidos desplegados como agregados de proteínas se debe a que lo que reconocen son motivos cortos de unos 5 aminoácidos hidrofóbicos

que están flanqueados por aminoácidos con carga positiva que se reproducen en la mayoría de las proteínas cada 30-40 aminoácidos (Rüdiger et al., 1997).

Estructuralmente, son proteínas de 70 kDa aproximadamente, que poseen 2 dominios principales: uno de 43 kDa, el dominio de unión a nucleótido (NBD), y otro de 27 kDa, el dominio de unión al sustrato (SBD), estando ambos conectados por un linker que también está muy conservado (Bukau y Horwich, 1998; Mayer, 2013). El NBD está compuesto por 4 subdominios (IA, IB, IIA y IIB) dispuestos en forma concéntrica y entre los cuales se encuentra el centro de unión del nucleótido (Flaherty et al., 1990). Las zonas situadas alrededor del centro están formados por aminoácidos hidrofílicos. Todos los subdominios participan en la unión del ATP. El SBD, por otro lado, se divide en dos subdominios que forman una especie de gancho que rodea a la proteína sustrato (Zhu et al., 1996). El primer subdominio contiene centro de unión hidrofóbico formado por una doble capa β -sandwich trenzada (SBD β). El segundo presenta una estructura de α -hélice y se pliega sobre el primero cerrando el sitio de unión.

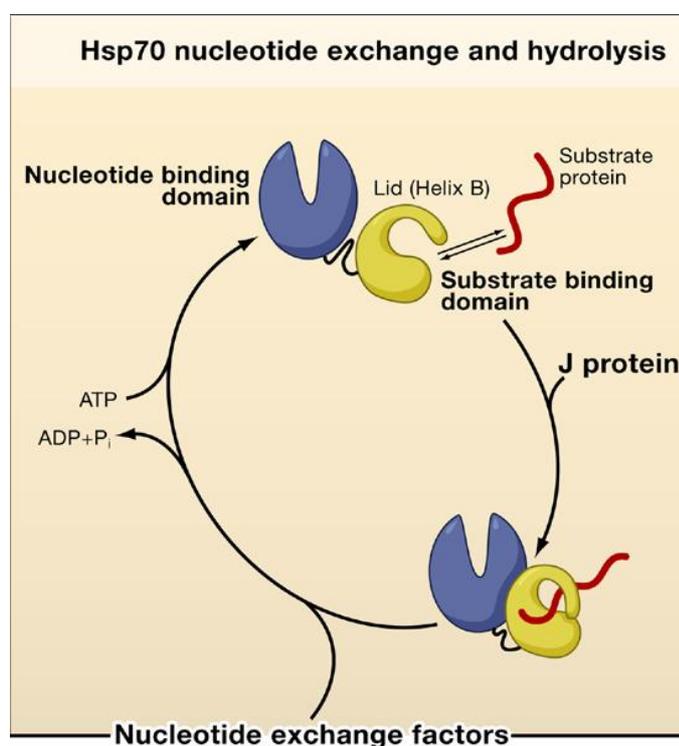


Figura 1. Ciclo de intercambio de nucleótido e hidrólisis por el que la Hsp70 lleva a cabo sus funciones. Imagen tomada del artículo de Bukau et al., 2006.

El mecanismo funcional de todas las Hsp70 se basa en una comunicación alostérica compleja entre los dos dominios que permite a la chaperona oscilar entre una conformación abierta o cerrada (Figura 1). Cuando en el NBD está unido el ATP, el SBD se encuentra en conformación abierta que permite la entrada del sustrato peptídico. La unión del sustrato estimula la actividad ATPasa de la Hsp70 (Mayer y Bukau, 2005), produciéndose la hidrólisis del ATP a ADP y fosfato inorgánico, haciendo que el SBD pase a conformación cerrada que presente mayor afinidad por el sustrato. La eliminación del ADP y que en el centro se dé la entrada de otra molécula de ATP en NBD provoca la liberación del polipéptido unido y que la chaperona pueda realizar otro ciclo de plegamiento de más proteínas o solubilización de agregados. Para llevar a cabo este proceso con la velocidad necesaria para hacer frente a las necesidades de la célula, las Hsp70 colaboran con otras chaperonas complementarias como son las Hsp40 y los factores de intercambio de nucleótido (NEF) (Bukau et al., 2006). Estas co-chaperonas aumentan la velocidad del proceso por medio de 3 vías principalmente que van a ser explicadas a continuación. La estequiometría de cada uno de los componentes es muy importante a la hora de darse correctamente este proceso. Para que ocurra correctamente la concentración de las cochaperonas no pueden ser muy altas. Más concretamente, debe ser del orden de 10-20 veces menor al de las Hsp70. Para que se de el proceso de plegamiento es necesario que todos los componentes descritos estén presentes (Kampinga y Craig, 2010). El replegamiento de un sustrato proteico por el sistema Hsp70/Hsp40/NEF se ilustra en la Figura 2.

Las Hsp70 más estudiadas son la DnaK bacteriana, Ssa y Ssb en levaduras y la Hsc70 en humanos.

1.1.2. Hsp40 (proteínas J)

Las Hsp40 son chaperonas que colaboran con las Hsp70 para que lleven a cabo sus funciones (Kampinga y Craig, 2010). El tamaño de estas chaperonas es muy variable (no tienen porque rondar los 40 kDa), por lo que es más común llamarlas proteínas J. Esto se debe a que todas estas co-chaperonas tienen en común el dominio J.

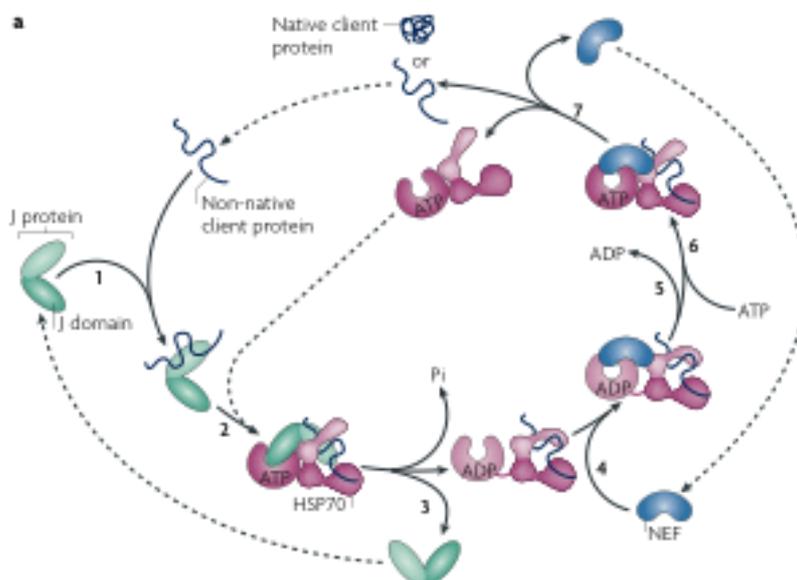


Figura 2. Simulación del mecanismo de actuación del sistema Hsp70-Hsp40-Hsp110 para el plegamiento de una proteína desnaturalizada.

Pese a que las Hsp70 presentan actividad ATPasa basal, su actividad es demasiado baja de por sí, por lo que la velocidad de transición de conformación abierta a cerrada es muy baja. Es el dominio J de estas proteínas el que aumenta su actividad ATPasa y por tanto también la velocidad del proceso. Se trata de una región de estructura helicoidal de unos 70 aminoácidos que contiene un tripéptido muy conservado formado por His, Pro y Asp, en un loop entre las dos hélices principales (HPD) (Pellechia et al., 1996). El motivo HPD es especialmente crucial en la función de la proteína J de estimular la actividad de las Hsp70 (Tsai y Douglas, 1996). El dominio J establece interacciones entre el dominio ATPasa y la región flexible contigua que está unida al SBD de la Hsp70. Estas interacciones son cruciales a la hora de transmitirse el cambio de conformación (Jiang et al., 2007).

Como se ha dicho anteriormente, el tamaño de las proteínas J es muy variable, siendo el dominio J, el único dominio común entre todas. Dependiendo de la presencia de varios dominios adicionales, las Hsp40 se dividen en las clases I, II y III. Las del tipo I presentan el dominio J en el extremo N-terminal, seguido de un dominio de unión a zinc y una extensión C-terminal que contiene un centro de unión de sustratos polipeptídicos a la Hsp70, incrementando la afinidad por el mismo (Lu y Cyr, 1998).

Las del tipo II presentan el dominio J N-terminal pero carecen del dominio zinc-finger. El resto de proteínas J que no tengan características entre los tipos I y II, se clasifican dentro del tipo III. Dado que estas clasificaciones no se deben a características relacionadas con su función bioquímica, los tipos II y III pueden tener otros dominios con funciones diferentes. Las proteínas J pueden presentar diferentes ubicaciones con consecuencias funcionales importantes (Kampinga y Craig, 2010, Figura 3). En algunos casos, la Hsp40 presenta un dominio transmembrana que lo adhiera a las membranas del RE o de la mitocondria por ejemplo.

La gran variedad estructural y funcional de las proteínas J posiblemente facilitan que las chaperonas Hsp70, más conservadas evolutivamente, puedan realizar una gran diversidad de funciones. De hecho en mamíferos existe una Hsp70 en mitocondrias y ER mientras que existen 4 y 6 proteínas J respectivamente. En humanos existen en total 11 Hsp70, 13 factores de intercambio de nucleótidos y 41 proteínas J.

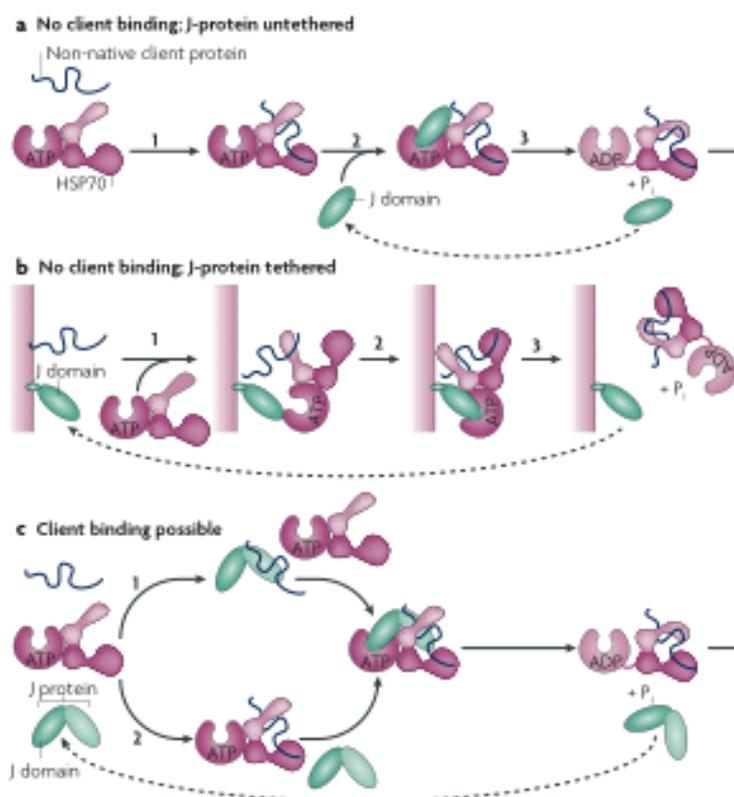


Figura 3. Ejemplos de la diversidad de las proteínas J. **a:** proteína J soluble que únicamente presenta el dominio J. **b:** proteína J que presenta un dominio transmembrana. **c:** proteína J que presenta dominios de unión al sustrato.

La proteína J más estudiada es la DnaJ bacteriana. En levaduras la más común es la Ydj1 y en humanos la Hdj1.

1.1.3. Hsp110 (Apg-2)

Las Hsp110 son otra familia de chaperonas cuya función también es colaborar con las Hsp70 actuando como factores para el intercambio de nucleótidos (NEF) (Andréasson et al., 2008). Además, existen otros tipos de intercambiadores de nucleótidos como las proteínas GrpE, HspBP1 y Bag-1 (Muga y Moro, 2008). Las Hsp110 presentan un alto grado de similitud en tamaño y estructura con las Hsp70 y hasta hace unos pocos años se les consideraba que pertenecían a esta familia. Es la tercera familia más abundante de chaperonas tras las Hsp70 y las Hsp90. Normalmente estas co-chaperonas se encuentran en el citosol, pero si se somete a las células a choque térmico, también aparecen en el núcleo y nucléolo (como ha demostrado Lee-Yoon et al., 1995).

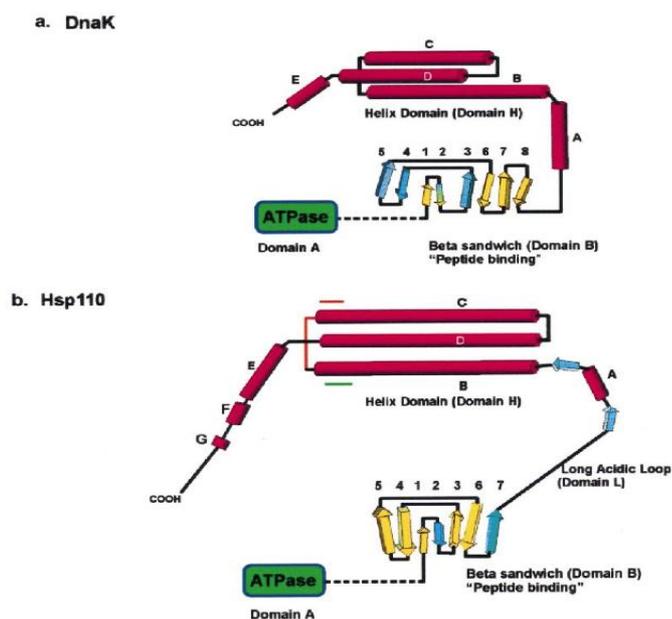


Figura 4. Comparación de la estructura de la Hsp70 DnaK (a) con la estructura de una Hsp110 (b). Imagen tomada del artículo de Easton et al., 2000.

Pese a que la estructura es muy similar a la de las Hsp70, hay zonas en las que difiere y hace que la función de ambos tipos de proteínas no sea la misma (Figura 4). Las principales diferencias consisten en una mayor divergencia del dominio ATPasa y la presencia de varias inserciones en el extremo C-terminal. Estas variaciones en la estructura están relacionados con la actividad de intercambio de nucleótidos. Las

variaciones en la región de unión al ATP hacen que la Hsp110 no posea la actividad ATPasa o esté muy disminuida y que al unirse el nucleótido se da un cambio conformacional que hace que interactúe con la Hsp70 (Figura 5). De este modo se favorece el intercambio de nucleótidos y, por tanto, la regeneración de la chaperona para realizar un nuevo ciclo (Dragovic et al., 2006). Es necesario la unión previa del ATP a la Hsp110 para que se de la interacción con la Hsp70. Pese a tener el dominio de unión a sustrato, la actividad de plegamiento está muy disminuida en estas proteínas (Easton et al., 2000).

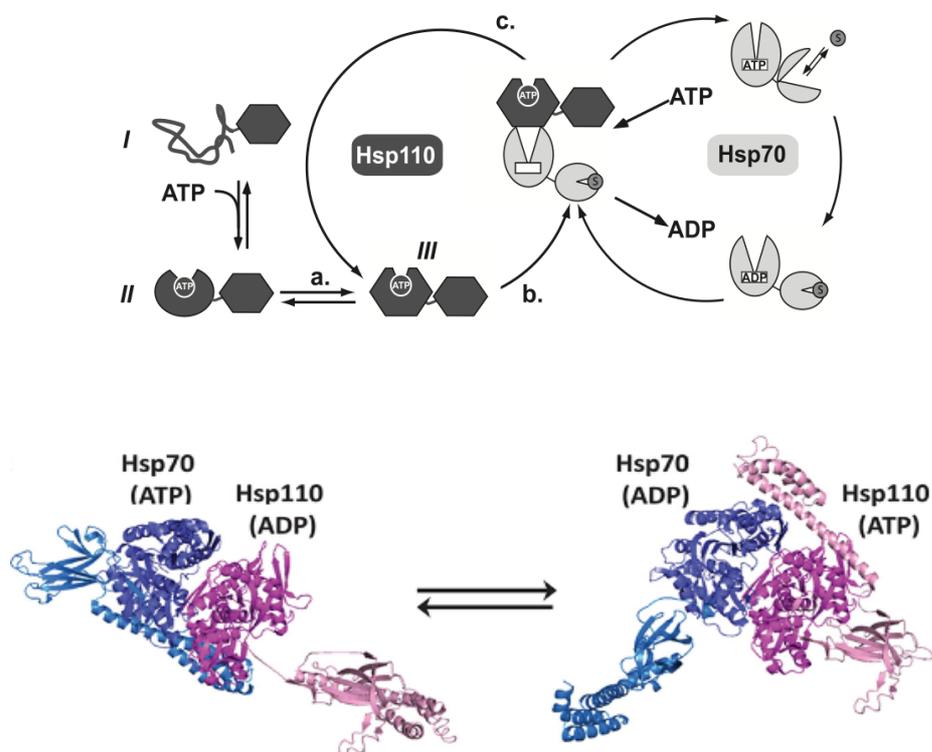


Figura 5. En la primera imagen se ve una simulación del mecanismo para el intercambio de nucleótidos entre Hsp110 y Hsp 70. En la segunda imagen se ve el cambio que sufre la interacción al producirse el intercambio.

En concreto, durante este proyecto, la chaperona objeto de estudio ha sido la Apg-2 (HSPH2), una Hsp110 de humanos. Presenta como curiosidad la capacidad de favorecer la liberación de los sustratos de la Hsp70 incluso sin tener unido el ATP (Mattoo et al., 2013).

La Apg-2 humana, colabora con el complejo Hsp70-Hsp40 para desagregar complejos de proteínas, especialmente para agregados desordenados y amorfos

(Shorter, 2011; Rampelt et al., 2012). En este caso, la Hsp70 con la ayuda de las co-chaperonas ya mencionadas, extrae una proteína de los agregados por cada ciclo de hidrólisis de ATP, consiguiendo solubilizarlos en el citoplasma al forzar su plegamiento al estado nativo.

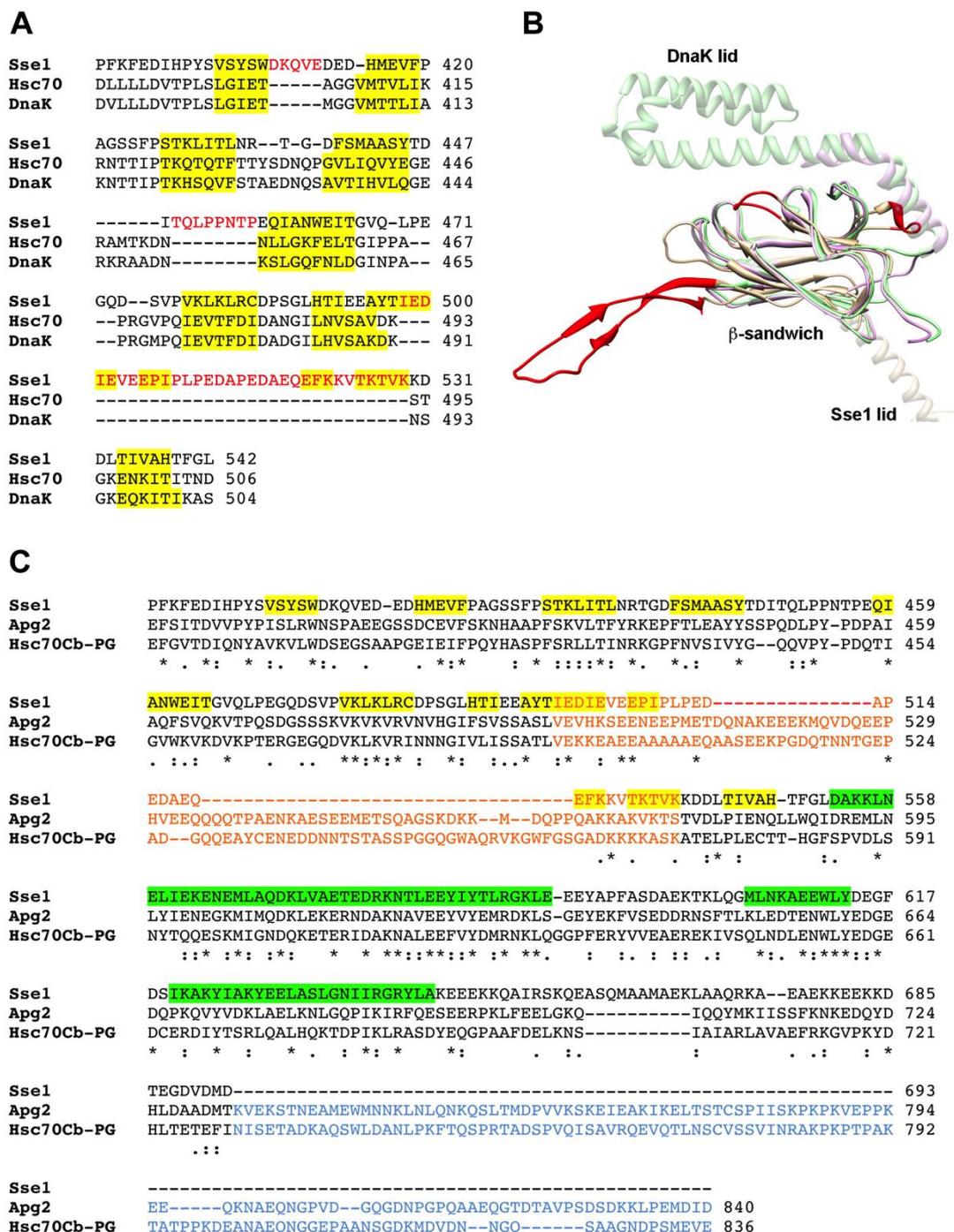


Figura 6. A: comparación de las secuencias peptídicas de la Hsp110 y de 2 Hsp70 (Hsc70 y DnaK). **B:** Imagen tridimensional de la comparación de las proteínas del apartado "A". **C:** comparación de la secuencia aminoacídica de la Sse1 de levaduras y la Apg-2 humana.

1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de estudio se basa en que la Apg-2 complementa el sistema Hsp70/Hsp40 humanas para promover la solubilización y replegamiento de agregados proteicos, mientras que el sistema homólogo en levaduras Sse1p/Ssa1p/Ydj1p, requiere la colaboración de la desagregasa Hsp104, una chaperona ausente en humanos (Raviol et al., 2006; Rampelt et al., 2012).

Lo que se quiere probar en esta investigación es la función que tienen los dominios divergentes que posee la Apg-2 (Figura 6A y B), en concreto: la inserción de un loop entre las hebras $\beta 7$ y $\beta 8$ del β -sandwich y la extensión del extremo C-terminal, en el mecanismo de actuación de esta proteína. Es interesante destacar que estas inserciones son mas grandes y presentan una baja homología respecto al homólogo en levaduras Sse1p (Figura 6C). Para ello se pretende generar dos mutantes de Apg-2 que sean defectivos en estos dos dominios mencionados: Apg-2 Δ L, en el que se eliminan los residuos 504-569, y Apg-2 Δ C, en el que se elimina el extremo C-terminal (residuos 733-840).

El objetivo de este proyecto es el clonaje y expresión recombinante de tanto la proteína nativa como los dos mutantes de eliminación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PLÁSMIDOS, OLIGONUCLEÓTIDOS Y ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Los plásmido empleados en este trabajo han sido:

- pcDNA5/FRT/TO HSPH2 obtenido de Addgene, en el que se encuentra clonado el cDNA de Apg2 (Hageman y Kampinga, 2009).
- pE-SUMO (LifeSensors, Malvern, USA), vector de expresión de proteínas fusionadas a una etiqueta que contiene 6 histidinas y la proteína SUMO.

Se han utilizado las distintas combinaciones de oligonucleótidos (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) para obtener las secuencias de DNA de la Apg-2 y sus dos mutantes Apg-2 Δ C y Apg-2 Δ L (Tabla 1).

Para la digestión de DNA plasmídico y fragmentos de PCR se han empleado los siguientes enzimas de restricción:

- BsmBI (New England Biolabs, Hertfordshire, Reino Unido)
- XbaI (New England Biolabs, Hertfordshire, Reino Unido)
- BsaI (New England Biolabs, Hertfordshire, Reino Unido)
- XhoI (New England Biolabs, Hertfordshire, Reino Unido)

La ligación de los distintos fragmentos de DNA de Apg-2 se ha realizado con la DNA ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs, Hertfordshire, Reino Unido). Tanto las de restricción como la ligasa han utilizado el buffer Cutsmart.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación mediante PCR de Apg-2, Apg-2 Δ C y Apg-2 Δ L.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
HG2F	ATCGTCTCAAGGTATGTCGGTGGTGGGC
HG2R	GCTCTAGATCAATCAATGTCCATTTTCAGGAAG
HG2DCR	GCTCTAGATCATGTCATGTCAGCAGCATCC
HG2DLFa	ATGGTCTCAAGGTATGTCGGTGGTGGGC
HG2DLRa	ATGGTCTCAGCAGACTTGTGAACCTCCAC
HG2DLFb	ATGGTCTCACTGCAAAAGTGAAGACCAGTAC

2.2. PCR

Para la realización de las PCRs se ha utilizado la DNA polimerasa Pfu Turbo con su correspondiente buffer (New England Biolabs, Hertfordshire, Reino Unido). La reacción se realizó en un termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hauppauge, NY, EEUU).

2.3. MEDIOS DE CULTIVO Y CEPAS CELULARES

Las cepas de *Escherichia coli* se han hecho crecer en medios líquidos Luria Broth (LB) (Pronadisa, Madrid, España) con la adición de antibióticos dependiendo del caso (cloranfenicol y/o ampicilina). La ampicilina se añade en concentración 100 µg/mg, mientras que el cloranfenicol la concentración es 35 µg/ml. También se han usado placas de agar LB complementadas con los antibióticos adecuados.

Las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo han sido:

- DH5α (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*).
- Rosetta (DE3) pLys (F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) pLysSRARE (Cam^R). La característica principal de esta cepa es que presenta un plásmido en el que tiene insertados los DNAs que codifican para una serie de tRNA de humanos, ya que el código genético entre bacterias y humanos es diferente y nos los usan en la misma proporción. Presenta los tRNA para los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y GCA. Además, en ese mismo plásmido tiene insertado un gen que le confiere resistencia a cloranfenicol. También posee la polimerasa y lisozima del fago T7.

2.4. PURIFICACIÓN DE DNA

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevo a cabo con el kit ATP Gel/PCR extraction kit (Teknokroma, Barcelona, España).

El protocolo seguido para esta purificación es el siguiente.

- a) Se extraen las bandas de DNA del gel de agarosa con la ayuda de un cúter estéril (evitar al máximo posible el contacto con la radiación UV necesaria para ver las bandas ya que puede producir mutaciones en las secuencias). Los trozos cortados se introducen en un tubo eppendorf.
- b) Se añaden en el eppendorf 500 µl del buffer DF, que sirve para poder disolver los trozos de gel extraídos.
- c) La mezcla se incuba durante unos 10-15 minutos, a una temperatura de 60 °C hasta conseguir disolver el gel (cada 2-3 minutos se voltean los tubos para

favorecer la disolución. Una vez disueltos se dejan enfriar los tubos a temperatura ambiente para continuar con la purificación.

- d) La mezcla obtenida se deposita sobre los filtros que aporta el fabricante en el kit y se centrifuga a 13000 rpm durante 30 segundos (se desecha el sobrenadante).
- e) Se añaden 600 µl del tampón de lavado, que consiste fundamentalmente en etanol, y se vuelve a centrifugar a 13000 rpm durante 30 segundos (se vuelve a desechar el sobrenadante).
- f) Se centrifuga durante 3 minutos para asegurarse de que el contenido del filtro se encuentra totalmente seco.
- g) El filtro se traspasa a un eppendorf normal de 1,5 ml estéril y se le añaden 35 µl de agua destilada (se añade agua, ya que se ha comprobado que para las enzimas de restricción que se usan en pasos siguientes, es mejor para su actividad que el tampón de elución del fabricante). Se deja reposar con el agua durante 5 minutos.
- h) Por último, se centrifuga a 13000 rpm durante 2 minutos para la recuperación de los productos de la PCR.

2.5. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Para la extracción del DNA plasmídico, se han utilizado los medios del ATP plasmid midi kit (Teknokroma, Barcelona, España) y se ha seguido el protocolo de hidrólisis alcalina (Sambrook y Russel, 2001).

A la hora de realizar esta recuperación del DNA plasmídico, se sigue el protocolo descrito a continuación.

- a) Se transfieren 1,4 ml del cultivo de los tubos a eppendorf de 1,5 ml.
- b) Se centrifuga durante 5 minutos a 8000 rpm, a una temperatura de 4 °C. Después se elimina el sobrenadante utilizando una bomba de vacío.
- c) Se resuspende secuencialmente con los 3 medios del ATP plasmid midi kit.
 - Resuspensión del pellet en 100 µl del medio I: 50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA.

- Lisis celular en 100 µl del medio 2: 0.2 M NaOH, 1% (p/v) SDS.
 - Neutralización en 100 µl del medio 3: 3 M acetato potásico, pH 4,8.
- d) Tras añadir los medios se centrifuga a 14000 rpm durante 10 minutos.
 - e) Se transfiere el sobrenadante a otro eppendorf limpio y estéril, desechando el pellet.
 - f) Se añaden 220 µl de isopropanol cada uno de los tubos que contienen los sobrenadantes.
 - g) Se centrifuga durante 15 minutos a 14000 rpm, a una temperatura de 4 °C.
 - h) Se retira el sobrenadante (utilizando una bomba de vacío).
 - i) Se resuspende el pellet en 500 µl de etanol al 75% (el etanol tiene que estar a -20 °C).
 - j) Se centrifuga a 14000 rpm durante 10 minutos, a una temperatura de 4 °C.
 - k) Se elimina el sobrenadante con ayuda de una bomba de vacío.
 - l) Se dejan secando los tubos a una temperatura de 35 °C aproximadamente el tiempo necesario hasta asegurarse de que todo el etanol se ha evaporado.
 - m) Se añaden a cada uno de los tubos 50 µl de agua destilada (para disolver el pellet se agitan los tubos en un thermomixer a una velocidad de 1000 rpm).

2.6. ELECTROFORESIS DE DNA Y PROTEÍNAS

2.6.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Esta técnica se realiza como explican Maniatis et al., 1982. Las moléculas de DNA viajan del polo negativo al positivo debido a la carga neta negativa que poseen los grupos fosfato. Por tanto, al poseer todas las moléculas la misma relación carga/masa, la migración diferencial depende exclusivamente del tamaño de las hebras. Los geles de agarosa utilizados contienen un 1,5% de agarosa en TAE (EDTA 1 mM, ácido acético glacial 1,1% (v/v), Tris-HCl 40 mM pH 8). el marcador de DNA utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen (Life Technologies S.A.), Madrid, España). Los geles se tiñen con SYBR-*Safe* (Invitrogen, Madrid, España). Las muestras de DNA se preparan con tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%

(p/v), glicerol 30 % (v/v)). El marcador de DNA utilizado es 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen (Life Technologies S.A.), Madrid, España). El gel se hace correr en el mismo tampón TAE con un voltaje de 80 V.

2.6.2. Electroforesis de proteínas

Para detectar la proteína tras su inducción para la expresión se realiza un gel de SDS-PAGE (Laemmli et al., 1970). La electroforesis en SDS-poliacrilamida permite la separación de las proteínas en relación a su peso molecular, ya que el SDS hace que todas adquieran un relación masa/carga parecida. El gel se realizó de forma discontinua. El gel separador posee una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 10%, en tampón Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1 % (p/v), PSA 0,04% (p/v), TEMED 0,15% (v/v). El gel concentrado posee una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 4,7%. Destaca en este otro la aparición de SDS al 10% (peso/volumen). El tampón d carga de las muestras contiene Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 5% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v) y DTT 100 mM. Para correr el gel se realizó en tampón glicina 200 mM, Tris-HCl 25 mM a pH 8,3 y SDS al 1% (p/V) en sistemas de electroforesis mini-PROTEAN 3 (Bio-rad, Madrid, España), con un voltaje constante de 225 V.

Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (p/v), metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)) durante toda la noche y se destiñeron con la misma solución, pero sin el azul de Coomassie.

3. RESULTADOS

3.1. ESTRATEGIA DE CLONAJE

Para llevar a cabo el clonaje de los insertos de DNA de Apg-2 y sus mutantes, se ideó la estrategia descrita en la Figura 7.

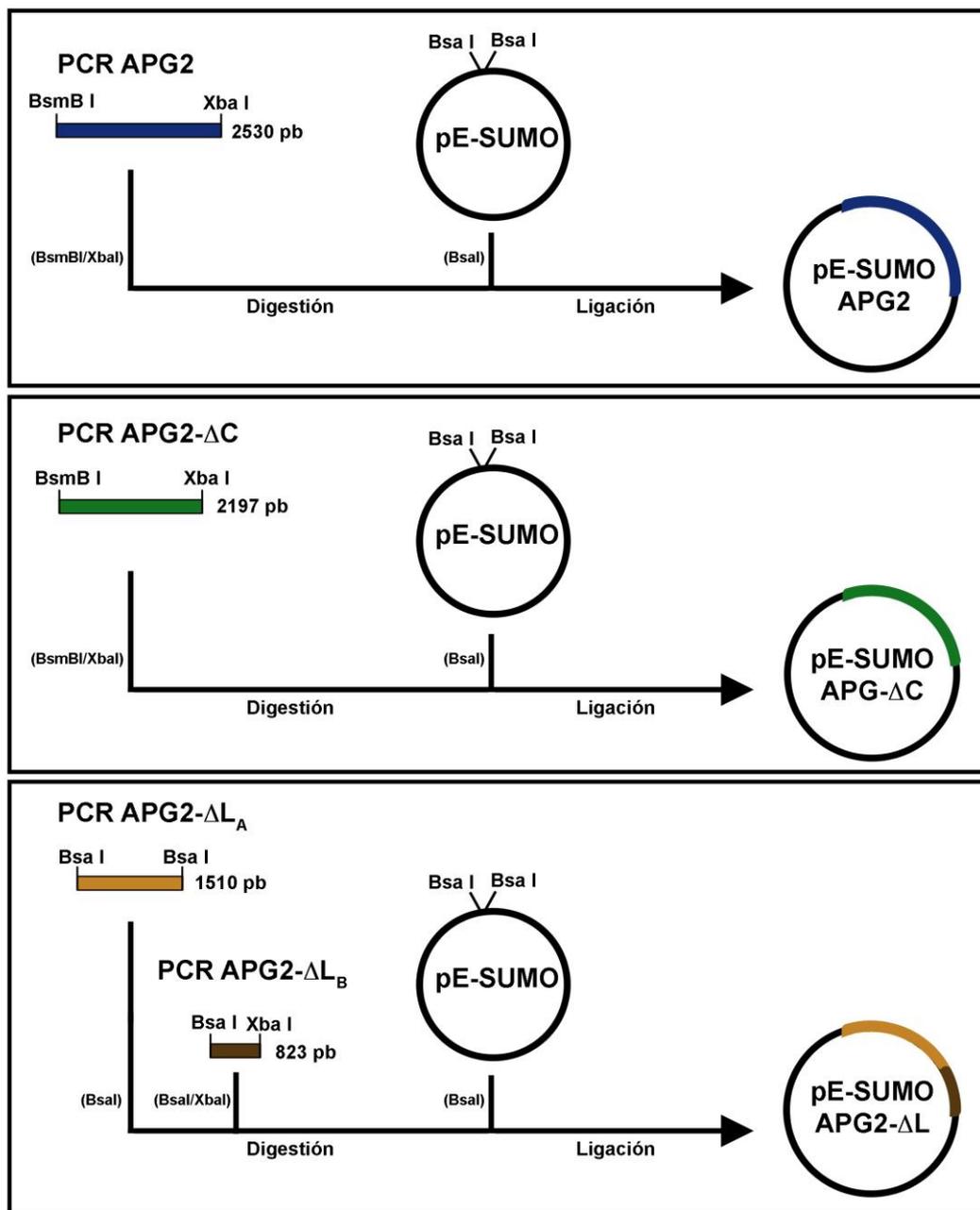


Figura 7. Estrategia seguida para insertar los diferentes fragmentos de Apg-2 objeto de estudio en el plásmido pE-SUMO Amp.

Esta estrategia hace uso de los enzimas de restricción clase IIS BsaI y BsmBI. La característica principal de estos enzimas de segunda generación es que reconocen una secuencias que no es palindrómica y cortan más adelante de la secuencia que reconocen (Figura 8); sin embargo, las de primera generación, cortan la secuencia detectada. Esta actividad presenta dos ventajas principalmente para estos enzimas: la primera es que cuando el sitio de reconocimiento de estos enzimas se encuentra en el extremo de un cebador para la PCR, este sitio es eliminado al digerirse, por lo que no habrá nucleótidos extra entre SUMO y la secuencia de la proteína de interés. La segunda ventaja es que la secuencia libre que deja el enzima tras la digestión es única.



Figura 8. Mapa del plásmido pE-SUMO donde se muestra la cola de histidinas, la proteína SUMO, el sitio de corte para Ulp1 y las secuencias de reconocimiento de Bsa I.

El plásmido de expresión elegido (pE-SUMO) presenta una cola de 6 histidinas para facilitar la purificación de la proteína a clonar y la proteína de fusión Smt3 (SUMO) que mejora la expresión, solubilidad y estabilidad de la proteína recombinante (Figura 8). El sitio de corte la proteasa específica Ulp1 (GlyGly) permite la liberación de la proteína de estudio de la etiqueta de afinidad. Como se observa en la figura, la digestión del pE-SUMO con BsaI deja libres las secuencias ACCT en el

extremo 5', y CTAG (compatible con el sitio de corte de XbaI) en el extremo 3'. Los oligonucleótidos usados para el clonaje de Apg-2 y los dos mutantes de eliminación (Tabla 1) fueron diseñados acorde a estas secuencia. En el caso del mutante APG-2DL se empleo el enzima BsaI para generar secuencias compatibles en el extremo 3' y 5' de los fragmentos A y B, respectivamente, de modo que se eliminaron la secuencia comprendida entre los residuos 504-569 de Apg-2.

3.2. PCR DE LAS DISTINTAS SECUENCIAS DE Apg-2

A la hora de realizar las PCRs de cada una de las secuencias de Apg-2 (Apg-2WT, Apg-2 Δ C y Apg-2 Δ L), Se preparó un tubo de 100 μ l para cada fragmento a amplificar (ver Tabla 2), empleando como molde el plásmido pcDNA5 HSPH2, que contiene el cDNA de Apg-2.

Para llevar a cabo la PCR, se calienta primera a 94 °C 30 segundos para la desnaturalización de las hebras de DNA. Seguidamente, se disminuyó la temperatura hasta la adecuada para que cada uno de los oligos se unan a los moldes de DNA durante 30 segundos. La temperatura idónea de hibridación se obtuvo realizando un gradiente de temperatura para todos los fragmentos entre 45 y 65 °C (Figura 9). Se puede observar en las imágenes como para WT, Δ C y Δ LA la mejor temperatura es la de 65 °C, porque la banda es más nítida (sin suciedad). Para Δ LB, está en las primeras bandas (45-50 °C). Después, se calentó a 72 °C durante 3 minutos para que la polimerasa actuase. Estos tres pasos se repitieron 30 veces para amplificar los fragmentos. La consecución de esta amplificación se realizó en un termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hauppauge, NY, EEUU).

Tabla 2. Cantidades necesarias de cada componente para realizar la PCR con cada fragmento.

	APG-2		APG-2ΔC		ApG2ΔL		ApG2ΔL
Molde	1 μl	Molde	1 μl	Molde	1 μl	Molde	1 μl
HG2F	1 μl	HG2F	1 μl	HG2DLFa	1 μl	HG2DLFb	1 μl
HG2R	1 μl	HG2DCR	1 μl	HG2DLR a	1 μl	HG2R	1 μl
dNTP	4 μl	dNTP	4 μl	dNTP	4 μl	dNTP	4 μl
Pfu Turbo	1 μl	Pfu Turbo	1 μl	Pfu Turbo	1 μl	Pfu Turbo	1 μl
Buffer 10x	10 μl	Buffer 10x	10 μl	Buffer 10x	10 μl	Buffer 10x	10 μl
H2O	82 μl	H2O	82 μl	H2O	82 μl	H2O	82 μl

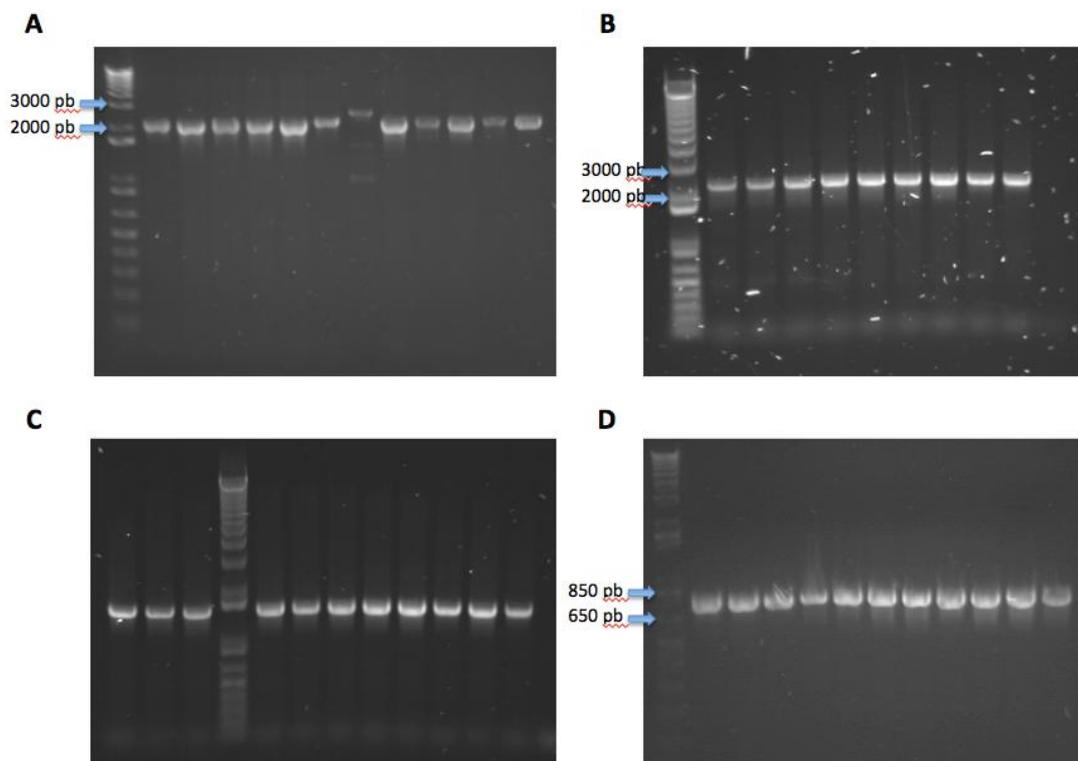


Figura 9. **A:** gradiente de temperatura en gel de agarosa para Apg-2WT, en el que se observa que las 2-3 últimas calles son las más nítidas y mejor han corrido. **B:** gradiente para Apg-2ΔC, en el que se ve más nítida la última calle. **C:** gradiente para Apg-2ΔLA en el que se ve que la última calle es la más nítida. **D:** gradiente de temperatura para Apg-2ΔLB, en el que las 3 primeras calles son las más nítidas.

Una vez realizadas las PCRs, se tomó una muestra de 5 μ l de cada tubo añadiéndole el volumen necesario de tampón de carga, que es 1:6 (volumen tampón/volumen total), para cargarlas en un gel de agarosa (1,5% peso/volumen de agarosa) y observar los fragmentos (Figura 10).

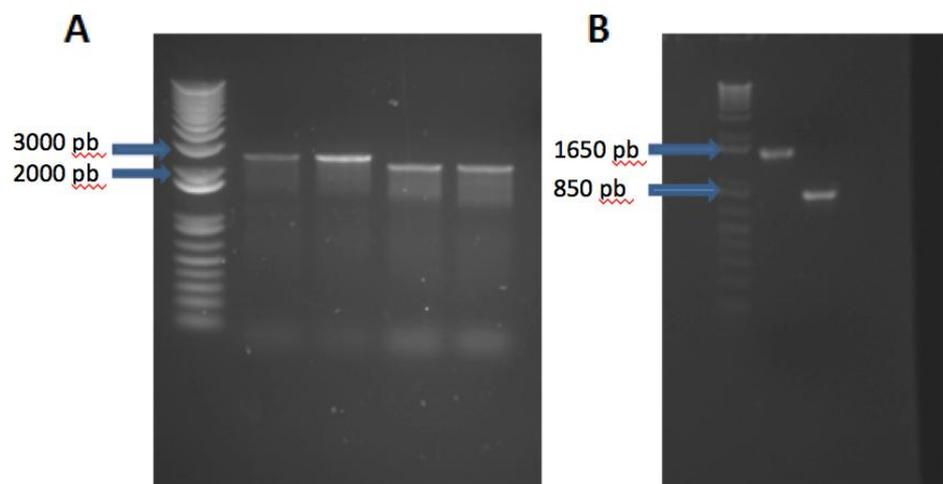


Figura 10. Geles de agarosa para purificar los productos de la PCR. **A** (de izquierda a derecha): Marcador 1 kb, Apg-2WT, Apg-2WT (2530 pb), Apg-2 Δ C, Apg-2 Δ C (2197 pb). **B** (de izquierda a derecha): Marcador 1 kb, Apg-2 Δ LA (1510 pb), Apg-2 Δ LB (823 pb).

3.3. PURIFICACIÓN DEL DNA OBTENIDO EN LAS PCRS

Para la purificación del DNA obtenido a partir de las PCRS, primero se realiza un gel de agarosa al 1,5% como en el paso anterior, con la diferencia de que en este caso se añaden al gel los productos de la PCR al completo.

Después se siguió el protocolo del Gel/PCR extraction kit (Teknokroma, Barcelona, España) descrito en materiales y métodos para recuperar el DNA de cada uno de los fragmentos.

De la mezcla resultante se toman 5 μ l que se cargan en un gel de agarosa al 1,5% (p/V) para comprobar que efectivamente se ha recuperado el DNA.

3.4. DIGESTIÓN DE LOS FRAGMENTOS Y EL PLÁSMIDO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para llevar a cabo la digestión con los enzimas de restricción se realizan las mezclas necesarias para cada uno de los fragmentos según se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Volúmenes (μl) de cada componente añadidos para realizar las mezclas de digestión de cada fragmento y el plásmido.

FRAGMENTO	Apg-2WT	Apg-2 Δ C	Apg-2 Δ LA	Apg-2 Δ LB	pE-SUMO
PCR (DNA de la purificación)	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	10 μl
XbaI	1 μl	1 μl	--	1 μl	--
BsmBI	1 μl	1 μl	--	--	--
BsaI	--	--	1 μl	1 μl	1 μl
Cutsmart (buffer)	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
Agua destilada	9 μl	9 μl	10 μl	9 μl	25 μl

Las mezclas de digestión se incubaron a 37 °C de temperatura durante 1 hora. En los casos de Apg-2WT y Apg-2 Δ C, que utilizaban los enzimas de restricción XbaI y BsmBI, primero se realizó la reacción con XbaI a 37°C y posteriormente se añadía BsmBI y se incubó 55°C. Tras los procesos de digestión, el DNA es recuperado por medio del mismo protocolo de purificación descrito en el punto anterior. Los fragmentos digeridos se muestran en la Figura 10.

3.5. LIGACIÓN DE LOS INSERTOS EN EL PLÁSMIDO

A la hora de realizar la ligación, se realizaron las siguientes mezclas para los diferentes insertos (Tabla 4, Figura 11). Hay que tener en cuenta que a partir de este momento, los fragmentos Apg-2 Δ LA y Apg-2 Δ LB se unen para conseguir el inserto Apg-2 Δ L.

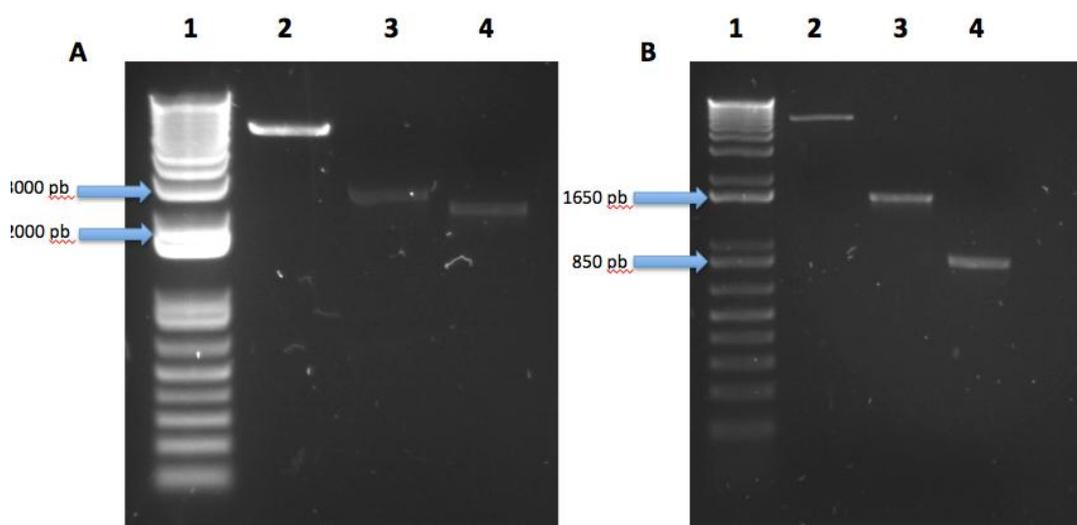


Figura 11. (calles de izquierda a derecha) geles de agarosa para los fragmentos previos a la ligación **A:** 1) Marcadores 1 kb, 2) pE-SUMO, 3) Apg-2WT, 4) Apg-2ΔC. **B:** 1) pE-SUMO, 2) Apg-2ΔLA, 3) Apg-2ΔLB, 4) Marcadores 1 kb.

Tabla 4. Volúmenes necesarios de cada componente para la obtención de la ligación de cada inserto en el plásmido.

FRAGMENTO	Apg-2WT	Apg-2ΔC	Apg-2ΔL	
T4 Ligasa	1 μl	1 μl	1 μl	
Buffer 10x	1 μl	1 μl	1 μl	
pE-SUMO	1 μl	1 μl	2 μl	
Inserto	7 μl	7 μl	ΔLA	4 μl
			ΔLB	2 μl

Una vez se han realizado las mezclas, los tubos se mantienen en un baño con agua a 14 °C y se dejan durante toda la noche ligando.

3.6. TRANSFORMACIÓN DE LOS VECTORES CLONADOS EN DH5α

Es importante que antes de electroporar las células, todos los componentes sean mantenidos en hielo porque las altas temperaturas afectan negativamente a la cepa.

Primero se dejan reposar en hielo los productos de ligación obtenidos en el paso anterior, las células electrocompetentes (50 μl en eppendorf de 0,5 ml), las cubetas donde se realizará el pulso a las células y 1 ml de medio LB en eppendorf de 1,5 ml.

El siguiente paso es añadir 1-2 μ l de los productos de ligación a las células electrocompetentes, mezclarlo todo y dejarlos reposar durante 10 minutos aproximadamente.

Es ahora cuando se realiza la transformación en el electroporador GenePulser Xcell (Bio-Rad). Para ello, con una pipeta estéril, se transfieren la mezcla de las células a una de las cubetas de electroporación (es fundamental evitar que se formen burbujas dentro de la cubeta porque evitarían que pase la corriente e incluso daría un chispazo a las células, destruyéndolas). A continuación se les da un pulso (2,5 kV) y rápidamente se añade el medio LB frío dentro de la misma cubeta para evitar que las células sufran. Para acabar el electroporado se transfiere todo al eppendorf del medio y se dejan reposar durante 10 minutos en el hielo para que vuelvan a enfriarse.

Se dejan los tubos con las células creciendo durante unos 30-40 minutos a 37 °C en un thermomixer (Thermomixer confort, Eppendorf, Hauppauge, NY, EEUU), con agitación.

Por último, los tubos se centrifugan a 6000 rpm durante 5 min, con una temperatura de 4 °C, para posteriormente retirar el sobrenadante, a excepción de 100 μ l que son necesarios para resuspender el pellet. De ahí se toman 50 μ l y se vierten en una placa de agar LB con ampicilina con concentración 100 μ g/ml (el antibiótico se añade para la selección de las células transformadas ya que el plásmido posee un gen que confiere resistencia a la célula frente a este antibiótico) y se expande por toda la placa utilizando una escobilla estéril.

3.7. MINIPREPS PARA LA EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO DE DH5 α

Dado que la cepa en que se ha realizado la transformación de los productos de ligación no es capaz de sintetizar las proteínas a partir del DNA insertado, es necesario introducir los plásmidos en otra cepa que pueda expresar la proteína.

Después de dejar crecer las placas del paso anterior durante un día, se puede apreciar cómo han crecido las colonias. De ellas, se seleccionan 8 ó 10, se pinchan y se cultivan en tubos de 10 ml estériles que contengan 2,5 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml), dejándolos crecer durante un día. El DNA plasmídico se extrajo siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior.

Para comprobar la correcta inserción de los fragmentos, los plásmidos obtenidos en la minipreps se digirieron con el enzima de restricción XhoI. Se escoge esta enzima porque presenta los sitios de corte en la base 503 dentro de pE-SUMO y en la base 1118 de la secuencia de Apg-2 (Figura 12). Como los mutantes que se quieren probar presentan los fragmentos eliminados por detrás de esta base, cuando se corta con el enzima, aparecen fragmentos diferenciales dependiendo si es la proteína nativa o alguno de sus mutantes (Para Apg-2WT, 1451 pb; para Apg-2 Δ C, 1128 pb, y para Apg-2 Δ L, 1248 pb).

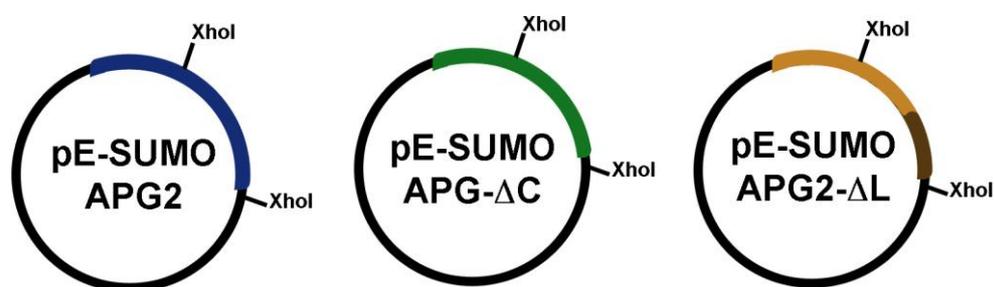


Figura 12. Imagen explicativa en la que se ve el plásmido con los 3 insertos y los puntos de corte para XhoI en cada uno.

El DNA plasmídico extraído de las células se digiere con el enzima de restricción XhoI (Tabla 5). Las mezclas se incuban a una temperatura de 37 °C durante 1-2 horas.

Tabla 5. Volúmenes utilizados en la preparación de las mezclas de digestión de las minipreps.

COMPONENTES	VOLÚMENES
Minipreps	5 μ l
XhoI	0,25 μ l
Cutsmart (Buffer 10x)	1 μ l
Agua destilada	3,75 μ l

Tras la digestión de los plásmidos, se transfieren a un gel de agarosa al 1,5% para comprobar qué colonias han conseguido transformarse con el inserto (Figura 14).

Como se observa en la Figura 14 se obtuvieron colonias positivas para los tres insertos.

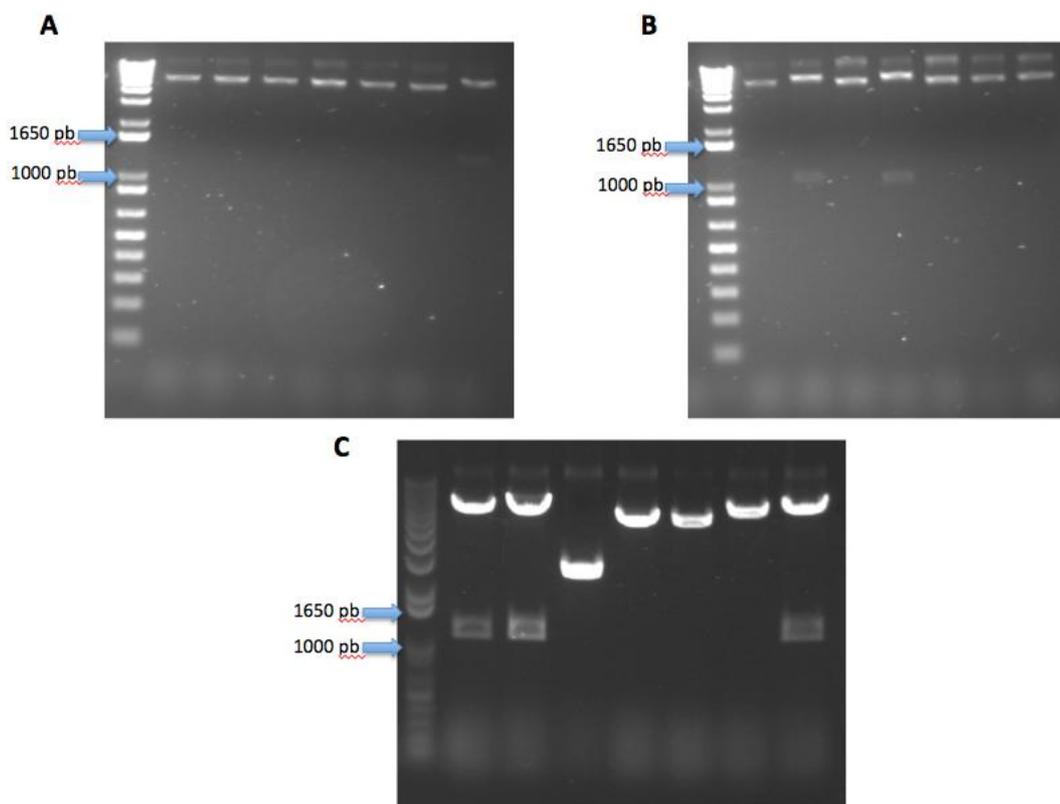


Figura 13. Gel de agarosa de los plásmidos purificados y digeridos con XhoI. Se observa como la última colonia de Apg-2WT (1451 pb), las colonias 2 y 4 de Apg-2 Δ C (1128 pb) y las colonias 1, 2 y 7 de Apg-2 Δ L presentan el plásmido con el inserto de DNA correspondiente a cada proteína.

3.8. ENSAYO DE SOBREEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Se realiza una transformación siguiendo el mismo protocolo del paso 3.7. del DNA plasmídico de una colonia que haya insertado los insertos. En este caso la cepa de *E. coli* en la que se produce la transformación es la BL21 Rosetta descrita en materiales y métodos.

Los productos de la transformación se hacen crecer, tras centrifugar a 6000 rpm (4 °C de temperatura) y resuspender el pellet en 100 μ l de medio, en placas de agar LB. Destacar que en este caso, además de añadirle 100 μ g/ml de ampicilina, también se le pone cloranfenicol al tener esta cepa en el plásmido mencionado un gen que le confiere resistencia frente a este antibiótico (la concentración del cloranfenicol es de 35 μ g/ml). Las placas se dejan creciendo durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.

Al día siguiente aparecieron colonias en las placas. En cada placa se pinchó una de las colonias y se pusieron los palillos en matraces que contenían 10 ml de medio LB y ampicilina y cloranfenicol en concentraciones 100 µg/ml y 35 µg/ml respectivamente. Se dejan crecer los matraces y al día siguiente, después de que hayan crecido, se diluye el cultivo transfiriendo 1 ml a un matraz de 25 ml de medio LB (con ampicilina y cloranfenicol). Se dejan estas diluciones creciendo a 37 °C hasta que los medios alcanzan una DO (densidad óptica) de 0,6. La DO se mide utilizando un espectrofotómetro a 550 nm.

Una vez los matraces han alcanzado la DO, se indujo la sobreexpresión de la proteína. Antes de la inducción se toma una alícuota de 500 µl para luego comparar en el gel. Para ello, se le añade a los matraces NaCl en concentración 0,3 M. Es necesario hacer un stock en medio LB de concentración 3 M, por lo que a los matraces se les añade 2,5 ml de este stock. Se añade sal porque favorece la expresión de la proteína. Además, se añade IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, que es el componente principal que induce la sobreexpresión. Se dejan los matraces creciendo durante 4 horas a 37 °C, tomando alícuotas de 500 µl a las 2 y 4 horas.

Acabada la inducción, se centrifugan las alícuotas a 6000 rpm durante 5 minutos (temperatura de 4 °C). Después se retira el sobrenadante con la ayuda de una bomba de vacío y el pellet se resuspende con 100 µl del medio descrito por Laemmli y colaboradores. La resuspensión se realiza en un vórtex durante el tiempo suficiente para asegurarse de que las células se hayan roto. Luego se calientan durante 5 minutos a 100 °C para que las muestras pierdan viscosidad y finalmente se cargan en un gel de SDS-PAGE 12 µl de cada muestra (Figura 14). Tras la tinción del gel con Coomassie, se observó la sobreexpresión de las tres proteínas clonadas.

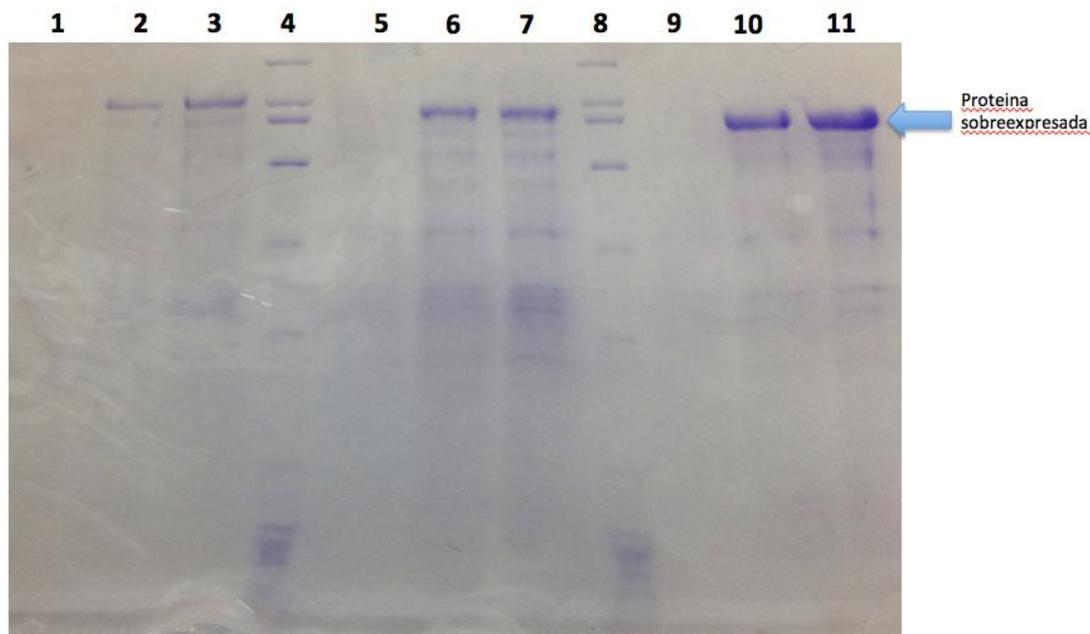


Figura 14. Gel SDS-PAGE (10% acrilamida) del ensayo de sobreexpresión (calles de izquierda a derecha). **1)** Apg-2 sin inducir, **2)** Apg-2 a las 2 h, **3)** Apg-2 a las 4 h, **4)** Marcadores de peso molecular, **5)** Apg-2 Δ L sin inducir, **6)** Apg-2 Δ L a las 2h, **7)** Apg-2 Δ L a las 4h, **8)** Marcadores de peso molecular, **9)** Apg-2 Δ C sin inducir, **10)** Apg-2 Δ C a las 2h, **11)** Apg-2 Δ C a las 4h.

4. DISCUSIÓN

A la vista de los resultados obtenidos, se puede observar que se consiguió realizar el clonaje de los insertos de DNA en la cepa de *E. coli* DH5 α con éxito. Es posible que en algunos insertos el proporción de colonias que tenían el plásmido con el inserto ligado fuera un poco más bajo de lo normal, pero tampoco se ha visto el estudio afectado por ello, ya que con que una de las colonias seleccionadas para las minipreps presentara el inserto era suficiente para luego transformar con ese DNA plasmídico la cepa de BL21 Rosetta.

Con respecto al ensayo de sobreexpresión, también podría decirse viendo los resultados obtenidos en la Figura 14, que los niveles de proteína obtenidos son bastante aceptables y que podría continuarse con el estudio a partir de estas células.

Como conclusión, se han conseguido alcanzar los objetivos propuestos antes de comenzar este estudio y esto permitirá avanzar con la investigación sobre la chaperona humana Apg-2.

4.1. PERSPECTIVAS

A partir de estas células de BL21 capaces de expresar la proteína Apg-2 y los mutantes realizados (Apg-2 Δ C y Apg-2 Δ L), se podrá probar la purificación de las proteínas mediante los siguientes pasos:

1. Unión a una resina de NiNTA.
2. Elución y corte del tag con Ulp1.
3. Unión del tag, proteína no cortada e impurezas a NiNTA. La proteína de interés se obtiene en la fracción no pegada en este paso.

Con la proteína ya purificada, se podrán hacer ensayos de actividad para así comprobar si los fragmentos eliminados de los mutantes afectan significativamente a la actividad desagregasa que posee la Apg-2, colaborando con la Hsp70 y la Hsp40, y que sus homólogas, como la Sse1p de levaduras, no poseen.

De esta manera podrá dilucidarse los papeles que desempeñan el loop y el extremo C-terminal de la proteína en la disolución de los agregados.

5. BIBLIOGRAFÍA

Andréarsson, C., Fiaux, J., Rampelt, H., Mayer, M.P., Bukau, B. 2008. Hsp110 is a nucleotide-activated exchange factor for Hsp70. *J. Biol. Chem.* 283: 8877-8884.

Bukau, B., Horwich, A. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* 92: 351-366.

Bukau, B., Weissman, J., Horwich, A. 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell.* 125: 443-451.

Dragovic, Z., Broadley, S.A., Shomura, Y., Bracher, A., Hartl, F.U. 2006. Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide Exchange factors of Hsp70s. *EMBO J.* 25: 2519-2528.

Easton, D.P., Kaneko, Y., Subjeck, J.R. 2000. The Hsp110 and Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones.* 5: 276-290.

- Flaherty, K.M., DeLuca-Flaherty, C., mckay, D.B. 1990. Three-dimensional structure of de ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*. 346: 623-628.
- Hageman, J., Kampinga, H.H. 2009. Computational analysis of the human HSPH/HSPA/DNAJ family and cloning of a human HSPH/HSPA/DNAJ expression library. *Cell Stress Chaperones*. 14: 1-21.
- Hartl, F.U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 475: 324-332.
- Jiang, J., Guy Maes, E., Taylor, A.B., Wang, L., Hinck, A.P., Lafer, E.M., Sousa, R. 2007. Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Mol Cell*. 28: 422-433.
- Kampinga, H.H., Craig, E.A. 2010. The Hsp70 chaperone machinery: J-proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 11: 579-592.
- Laemmli, U.K., Mölbert, E., Showe, M., Kellenberger, E. 1970. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol*. 49: 99-113.
- Lee-Yoon, D., Easton, D.P., Murawski, M., Burd, R., Subjeck, J.R. 1995. Identification of a major subfamily of large hsp-70 like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem*. 270: 15725-15733.
- Lu, Z., Cyr, D.M. 1998. The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *J. Biol. Chem*. 273: 5970-5978.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Mattoo, R.U.H., Sharma, S.K., Priya, S., Finka, A, Goloubinoff, P. 2013. Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates. *J. Biol. Chem*. 288: 21399-21411.

- Mayer, M.P., Bukau, B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 670-684.
- Mayer, M.P. 2013. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 38: 507-514.
- Muga, A., Moro, F. 2008. Thermal adaption of heat shock proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 9: 552-566.
- Nishikawa, S. Brodsky, J.L., Nakatsukasa, K. 2005. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J. Biochem.* 137: 551-555.
- Pellecchia, M., Szyperski, T., Wall, D., Georgopoulos, C., Wüthrich, K. 1996. NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the Escherichia coli DnaJ chaperone. *J. Mol. Biol.* 260: 236-250.
- Rampelt, H., Kirstein-Miles, J., Nillegoda, N.B., Chi, K., Scholz, S.R., Morimoto, R.I., Bukau, B. 2012. Metazoan Hsp70 machines use Hsp110 to power protein disaggregation. *EMBO J.* 31: 4221-4235.
- Raviol, H., Bukau, B., Mayer, M.P. 2006. Human and yeast Hsp110 chaperones exhibit functional differences. *FEBS Lett.* 580: 168-174.
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., Bukau, B. 1997. Substrate specificity of DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* 16: 1501-1507.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Shorter, J. 2011. The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. *PLoS One.* 6: e26319. doi: 10.1371/journal.pone.0026319.
- Tsai, J., Douglas, M.G., 1996. A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J. Biol. Chem.* 271: 9347-9354.

Young, J.C. 2010. Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem. Cell Biol.* 88: 291-300.

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