

Grado Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Reactivación de agregados proteicos por chaperonas moleculares

Egilea/Autor:
Maitane Asensio Martín

Zuzendaria/Director/a:
Arturo Muga Villate

INDICE

1. INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS.....	2
1.1. Plegamiento proteico y sistema de control de calidad celular	2
1.2. ClpB de Escherichia coli	3
1.3. Ciclo funcional del sistema DnaK/ClpB.....	4
1.4. Oligomerización de ClpB y formación de hexámeros híbridos	5
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
2.1. Proteínas empleadas	6
2.2. Cuantificación proteica	7
2.3. Obtención de hexámeros híbridos de ClpB.....	7
2.4. Actividad ATPasa de ClpB	8
3. RESULTADOS	9
3.1. Efecto de la incorporación de subunidades mutantes inactivas en la actividad ATPasa de ClpB.....	9
3.2. Efecto de la presencia del sistema DnaK en la actividad ATPasa de ClpB.....	11
4. DISCUSIÓN.....	12
5. CONCLUSIONES	14
6. BIBLIOGRAFÍA.....	16

1. INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS

1.1. Plegamiento proteico y sistema de control de calidad celular

Las proteínas se sintetizan como cadenas polipeptídicas lineales, pero adquieren una estructura tridimensional termodinámicamente estable y biológicamente activa durante el plegamiento proteico. En las enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad del Alzheimer o el Parkinson, la alteración del plegamiento de proteínas mutantes provoca la formación de agregados intracelulares. Además, numerosas condiciones de estrés ambiental como variaciones de temperatura, fuerza iónica o estrés oxidativo desestabilizan las conformaciones nativas de numerosas cadenas polipeptídicas aumentando el riesgo de agregación. En estos casos, los agregados formados pueden causar daños en las estructuras y metabolismo celular, afectando al crecimiento y comprometiendo la viabilidad celular.

En consecuencia, los organismos han desarrollado un sistema de control de calidad, formado por chaperonas moleculares y maquinaria proteolítica, encargado del plegamiento *de novo* y de prevenir la agregación de las proteínas mediante el replegamiento o la eliminación de las mismas (Figura 1). A pesar de ello, cuando el número de proteínas desplegadas es muy elevado, la función protectora de las chaperonas y de las proteasas se satura y los polipéptidos celulares con problemas de plegamiento agregan.

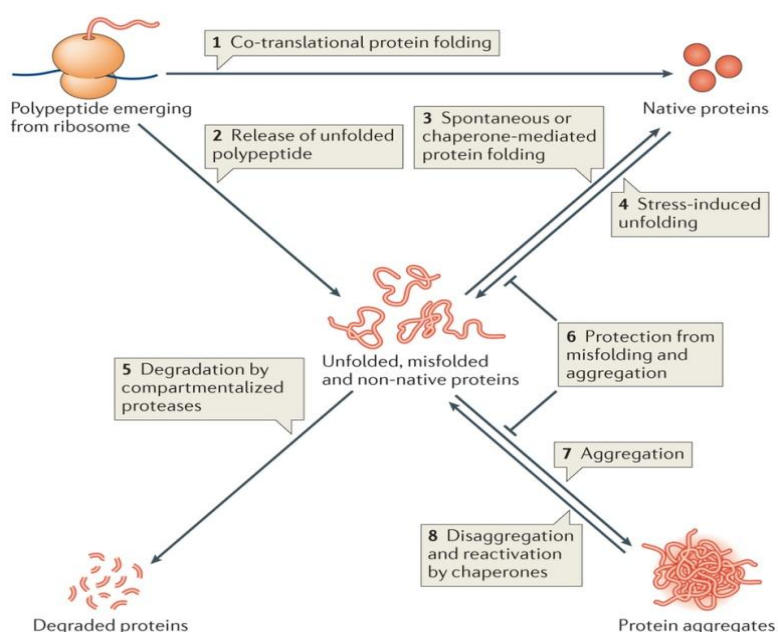


Figura 1. Sistema de control de calidad proteico. Las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas siguen su ruta de plegamiento a través de intermediarios hasta alcanzar su estado nativo. En este trayecto la presencia de condiciones desfavorables puede conducir al desplegamiento proteico y a la agregación proteica. Esta situación puede evitarse mediante la proteólisis de dichos sustratos desplegados o, alternativamente, puede ser revertida gracias a la acción de chaperonas moleculares. Imagen extraída de Doyle y cols., 2013.

Inicialmente se creía que la agregación proteica sólo se podía evitar mediante la acción de las chaperonas moleculares en los primeros pasos del proceso de plegamiento, y que los agregados formados no podían ser solubilizados y reactivados. Sin embargo, se ha demostrado que los agregados proteicos pueden ser reactivados por el sistema de chaperonas Hsp100- Hsp70- Hsp40, recuperándose la actividad y propiedades de las proteínas nativas (Mogk y cols., 2003). Por esta razón las chaperonas moleculares pertenecientes a estas familias resultan imprescindibles en la supervivencia de células sometidas a distintos tipos de estrés.

1.2. ClpB de Escherichia coli

ClpB (*Caseinolytic peptidase B*) de *E.coli* es una proteína hexamérica formada por monómeros idénticos de 95,5kDa y 857 aminoácidos que se expresa de forma constitutiva. Perteneciente a la familia de chaperonas Clp/Hsp100 de las proteínas AAA+ (*ATPase associated with various cellular activities*). Aunque su presencia no sea esencial en condiciones fisiológicas, es imprescindible en situaciones de estrés térmico (Mogk y cols., 1999). En estas condiciones su concentración se duplica y se encarga de desagregar los agregados proteicos formados, permitiéndole a *E.coli* resistir temperaturas elevadas, lo que se conoce como termotolerancia inducida. Esta función se ha conservado en su homólogo de levaduras Hsp104 (Sánchez y Lindquist, 1990; Parsell y cols., 1994).

Los seis monómeros de ClpB se asocian para formar un hexámero en forma de barril, con un poro central a través del cual se produce la translocación de la cadena polipeptídica extraída del agregado (Lee y cols., 2003). Cada subunidad contiene un dominio N-terminal, seguido de dos dominios de unión a nucleótido (NBD1 y NBD2) y un dominio intermedio, denominado dominio M, insertado dentro del NBD1 (Figura 2).

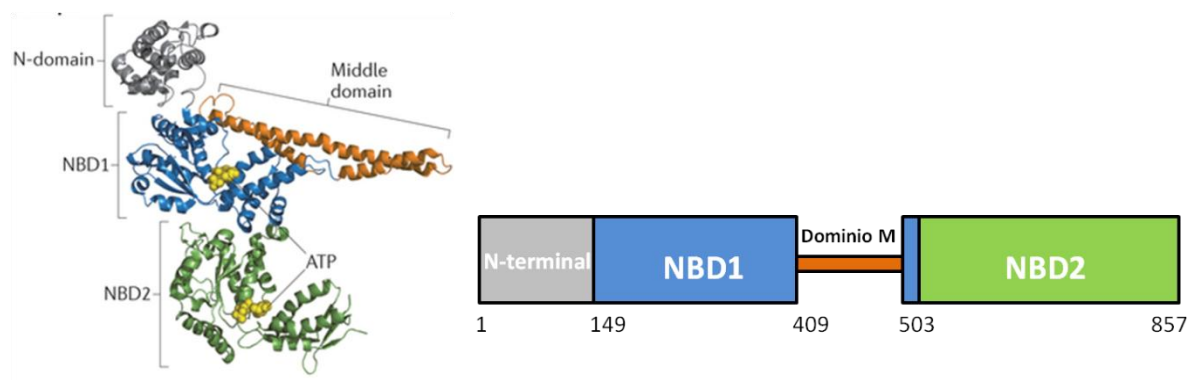


Figura 2. Estructura del monómero de ClpB. A la izquierda se muestra el modelo de estructura terciaria del monómero de ClpB y a la derecha, un esquema lineal de los 4 dominios de ClpB: El dominio N terminal, NBD1, Dominio M y NBD2.

El **dominio N terminal** parece estar implicado en el reconocimiento y unión de sustratos, especialmente en el caso de agregados grandes y estables (Barnett y cols., 2005; Lee y cols., 2003). Se encuentra unido al NBD1 a través de un *linker* flexible de 17 aminoácidos cuya flexibilidad controla la posición del dominio N, modulando eficiencia de la unión a sustratos y de la desagregación (Zhang y cols., 2012).

Cada monómero de ClpB contiene dos **NBDs**, que forman dos anillos hidrolíticos en el hexámero de la chaperona. Cada NBD contiene 2 motivos Walker (Walker A y Walker B) encargados de la unión e hidrólisis de nucleótido. Los NBDs están comunicados alostericamente tanto entre subunidades vecinas como entre NBDs de una misma subunidad. Estudios recientes demuestran que la afinidad de cada uno de los NBDs por el nucleótido es diferente siendo la afinidad del NBD2 superior a la del NBD1 (Fernandez-Higuero y cols., 2011).

El **dominio M** es una estructura flexible formada por cuatro α -hélices antiparalelas dispuestas en una estructura supersecundaria denominada *coiled-coil*. Es específico para ClpB y Hsp104 y se ha observado que es imprescindible para la actividad desagregadora de estas chaperonas (Mogk y cols., 2003). Además, regula la actividad ATPasa de la chaperona comunicando los NBDs de un mismo monómero, estabiliza la estructura oligomérica de ClpB y participa en la interacción con DnaK (Lee y cols., 2003; del Castillo y cols., 2011; Seyffer y cols., 2012; Carroni y cols., 2014).

1.3. Ciclo funcional del sistema DnaK/ClpB

En procariontes la reactivación de agregados estables requiere la actuación concertada de dos sistemas de chaperonas: el sistema DnaK formado por la chaperona DnaK, su cochaperona DnaJ y el intercambiador de nucleótido GrpE, y la chaperona ClpB.

La figura 3 ilustra el mecanismo secuencial de unión de las chaperonas al agregado proteico que describe la colaboración entre ClpB y el sistema DnaK. Primero, DnaJ une las regiones hidrofóbicas de las moléculas desplegadas que forman el agregado e interacciona con DnaK-ATP (estado de baja afinidad por el sustrato). DnaJ transfiere el agregado a DnaK y estimula su actividad ATPasa; el estado DnaK-ADP tiene mayor afinidad por el sustrato e interacciona de manera estable con el mismo. En este momento, DnaK puede remodelar el sustrato completando varios ciclos ATPasa en presencia de GrpE. Alternativamente, DnaK puede presentarle el sustrato a ClpB; como consecuencia, la actividad ATPasa de ClpB se activa y la chaperona extrae polipéptidos del agregado que posteriormente pueden ser replegados por el sistema DnaK (Acebron y cols., 2009). Durante la extracción, ClpB transloca los polipéptidos extraídos a través del canal central, proceso regulado por el ciclo de hidrólisis del ATP. La

unión e hidrólisis de ATP induce los cambios conformacionales que modulan la afinidad de ClpB por el sustrato.

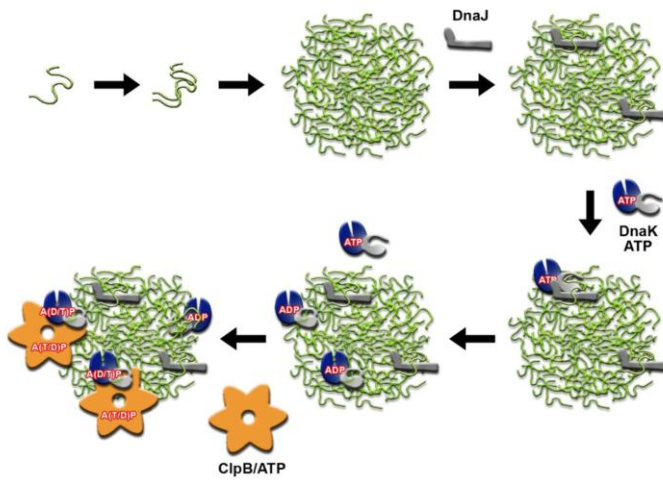


Figura 3. Ciclo funcional del sistema bichaperona ClpB-DnaK. Los agregados proteicos pueden ser solubilizados gracias al sistema bichaperona ClpB-DnaK. La asociación de las chaperonas al agregado se realiza en tres pasos: (i) unión de DnaJ al agregado, (ii) reclutamiento de DnaK por parte de DnaJ y (iii) asociación mediada por DnaK de ClpB a la superficie del agregado.

Así, se ha propuesto que el sistema Hsp70/DnaK tiene diversas funciones durante la desagregación: presenta los sustratos a Hsp104/ClpB, modula su actividad ATPasa y asiste en el plegamiento de aquellos polipéptidos extraídos por ClpB que no pueden plegarse espontáneamente (Doyle y Wickner, 2008).

1.4. Oligomerización de ClpB y formación de hexámeros híbridos

El hexámero de ClpB se caracteriza por su baja estabilidad, de manera que se encuentra constantemente en equilibrio entre su forma monomérica y oligomérica. En *E.coli*, el gen ClpB expresa dos isoformas, la isoforma completa (*full-length*) de 95,5kDa (ClpB95) y la isoforma truncada que carece de dominio N terminal de 80kDa (ClpB80), que es menos eficiente en la reactivación de agregados proteicos. En *E.coli* se forman heterohexámeros compuestos por subunidades silvestres y truncadas (ΔN) cuya actividad desagregasa es superior a la del homohexámero silvestre (Nagy y cols., 2010). Es comprensible entonces que la expresión de la isoforma truncada aumente en condiciones de estrés térmico (Chow y Baneyx, 2005). La mayor eficiencia reactivadora del heterohexámero se debe a la mayor libertad conformacional del dominio N de las subunidades silvestres en el híbrido, que le permite un mejor contacto con los agregados.

El dinamismo de su estructura oligomérica ha sido previamente empleado para generar especies híbridas entre protómeros silvestres y mutantes y poder así estudiar el efecto de distintas mutaciones en el mecanismo de acción de la chaperona. Nuestro grupo ha estudiado la actividad chaperona de hexámeros que incorporan subunidades mutadas en sus dos NBDS (E279A/E678A) de tal manera que ambos dominios son capaces de unir pero no de hidrolizar ATP. Dicha variante mutante se denomina

Trap o ClpB TT. Se observó que la presencia de una sola subunidad TT inhibe la capacidad del hexámero de replegar sustratos como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (del Castillo y cols., 2010). Sin embargo, el hexámero es capaz de incorporar hasta 3 subunidades mutantes siempre y cuando esas subunidades sólo tengan uno de sus NBDs inactivo y el otro funcional. Estos hechos demuestran que la utilización de nucleótido por parte del hexámero de ClpB se basa en la comunicación alostérica inter- e intra-monómero. A diferencia de la actividad replegadora de ClpB, la actividad ATPasa de los híbridos WT: E279A/E678A (WT: TT) no se inhibió por la presencia de protómeros mutantes sino que la capacidad de las subunidades WT de hidrolizar ATP se hiperestimuló.

Siguiendo con los experimentos previamente descritos y con el **objetivo** de saber qué función desempeñan los dominios flexibles de ClpB (el dominio N terminal y el dominio M) en dicha activación mediada por las subunidades TT y en la comunicación entre los distintos NBDs, se generarán oligómeros híbridos WT: TT, WT: TT Δ M y WT: TT Δ N y se caracterizará su actividad ATPasa. Se medirá la actividad ATPasa de estos oligómeros en dos condiciones: en ausencia y en presencia del sistema DnaK. De esta manera podremos estudiar el efecto de la chaperona DnaK en la actividad ATPasa de ClpB.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Proteínas empleadas

En este trabajo se han empleado las chaperonas ClpB y DnaK, así como la cochaperona DnaJ y el intercambiador de nucleótido GrpE, purificadas en el laboratorio a partir de cepas MC4100 de *Escherichia coli*. Las variantes mutantes de ClpB (TT, TT Δ N, TT Δ M y Δ M) también se expresaron en *E. coli*. Además se ha utilizado la α -caseína (Sigma-Aldrich) como sustrato modelo para estudiar la estimulación por sustrato de actividad ATPasa de ClpB.

El mutante ClpB Trap (TT) contiene sustituciones puntuales en el motivo Walker B de ambos NBDs (E279A/E678A) que le permite unir pero no hidrolizar ATP. Las variantes TT Δ N y TT Δ M contienen las mismas mutaciones puntuales y carecen del dominio N y M, respectivamente. Por otro lado, la variante ClpB Δ M carece del dominio intermedio M pero es una especie activa, es decir, une e hidroliza ATP.

2.2. Cuantificación proteica

Se prepararon muestras de las distintas variantes de ClpB (ClpB WT, TT, TT Δ N, TT Δ M y Δ M) a una concentración de 100 μ M para la obtención de los hexámeros híbridos. La cuantificación proteica de dichas muestras se realizó utilizando el método Bradford. Este método se basa en la propiedad que

tienen el azul Coomassie G de interaccionar con residuos de arginina y, en menor medida, con residuos de histidina, lisina, tirosina, triptófano y fenilalanina. El máximo de absorbancia de este compuesto azul sufre un desplazamiento batocrómico de 465 a 595 nm debido a la estabilización de su forma aniónica como consecuencia de las interacciones iónicas e hidrofóbicas que establece con la proteína. Para el cálculo de la concentración proteica se preparó paralelamente una recta patrón con 0-16µg de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich). Posteriormente se añadió a las muestras y a los patrones 1 ml del reactivo de Bradford BioRad (Hercules, CA, USA) (dilución 1:5). Se agitaron los tubos y se esperó 15 min antes de medir la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UVVisBiomate-3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU).

2.3. Obtención de hexámeros híbridos de ClpB

La formación de hexámeros híbridos de la chaperona ClpB se llevó a cabo mezclando oligómeros silvestres y mutantes a relaciones molares 6:0, 5:1, 4:2, 3:3, 2:4, 1:5 y 0:6. Como la combinación de subunidades es aleatoria, en cada caso no se genera una única población homogénea de oligómeros sino una serie de poblaciones diferentes que se puede definir mediante un modelo de distribución binomial.

Relación molar ClpB silvestre: ClpB mutante	Concentración de ClpB silvestre (µM)	Concentración de ClpB mutante (µM)
6 : 0	2	0
5 : 1	2	0,4
4 : 2	2	1
3 : 3	2	2
2 : 4	2	4
1 : 5	2	10
0 : 6	0	10

Tabla 1. Preparación de los híbridos de ClpB WT: ClpB mutante. Se presentan las concentraciones de chaperona empleadas para cada relación molar. Los mutantes utilizados fueron ClpB TT, TTΔN y TTΔM. En el caso del híbrido ClpB ΔM: ClpB TT, la concentración de ΔM se mantuvo constante a 2 µM y la de ClpB TT, por el contrario, varió.

Las mezclas de diferentes relaciones molares de las especies híbridas de ClpB WT: ClpB TT, ClpB WT: ClpB TTΔN, ClpB WT: ClpB TTΔM y ClpB ΔM: ClpB TT se prepararon en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 5 mM y KCl 50 mM. Se mezcló cada variante de ClpB a la concentración necesaria para conseguir la relación molar correspondiente (Tabla 1). Se mantuvo la concentración de ClpB silvestre constante a 2 µM en todos los casos, excepto para el heterohexámero ΔM : TT donde ClpB ΔM se mantuvo constante y a la misma concentración. De esta manera se excluye la posibilidad de que las posibles variaciones observadas en la actividad ATPasa se deban a la dilución de la proteína silvestre o ClpB ΔM, ambas activas. La mezcla se incubó durante dos horas para asegurar el intercambio de subunidades entre los homohexámeros y la formación de especies híbridas.

2.4. Actividad ATPasa de ClpB

Se estudió la actividad basal y estimulada por α -caseína de los oligómeros híbridos de ClpB. Para ello, se utilizó un método espectrofotométrico donde se acopla al ciclo de hidrólisis de ClpB un sistema regenerador de ATP y otro de consumo de NADH (Figura 4). El consumo de NADH es equivalente a la hidrólisis de ATP por parte de ClpB, por lo que la desaparición del NADH en el medio medida como el descenso de la absorbancia a 340nm permite calcular la cantidad de ATP consumido y con ello, la actividad ATPasa de la chaperona.

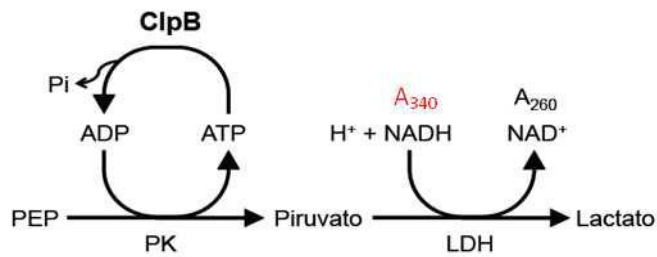


Figura 4. Diagrama del sistema acoplado empleado para medir la actividad ATPasa. La actividad ATPasa de ClpB genera ADP y fosfato inorgánico. El ADP formado junto con el fosfoenolpiruvato (PEP) presente en el medio actúa como sustrato del enzima piruvatocinasa (PK) que cataliza la conversión del PEP en piruvato, reacción en la que se regenera el ATP consumido. Dicho ATP puede volver a ser utilizado por ClpB e iniciar un nuevo ciclo de hidrólisis. El piruvato es sustrato de la lactato deshidrogenasa (LDH) en una reacción de reducción que tiene lactato como producto y que consume NADH. El consumo de NADH se mide a través de la disminución de la intensidad de la absorbancia a 340nm y es extrapolable al consumo de ATP por la chaperona, esto es, a la actividad ATPasa de la misma.

Se midió la actividad ATPasa de ClpB en tampón Tris 50 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 5 mM, KCl 50 mM, NADH 0,2 mM, PEP 6 mM, lactato deshidrogenasa (LDH) 0,017 mg/ml y piruvato kinasa (PK) 0,625 μ l registrando el descenso de la absorbancia del NADH a 340nm en un espectrofotómetro Cary 3 Bio a 25°C. Inicialmente, se midió la absorbancia del tampón hasta que la intensidad de absorbancia del NADH se mantuviera constante. Después, se añadió 2 μ M del híbrido correspondiente. Cuando la absorbancia del NADH se estabilizó de nuevo, se inició el ensayo con la adición de 2 mM ATP. La estimulación de la actividad ATPasa inducida por sustrato se caracterizó, posteriormente, añadiendo a la mezcla 10 μ M α -caseína. La velocidad de hidrólisis de ATP de ClpB expresada en moles $ATP \cdot mol\ ClpB^{-1} \cdot min^{-1}$ se calculó a partir de la pendiente de la variación de la absorbancia del NADH en función del tiempo, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADH ($\epsilon = 6220\ M^{-1} \cdot cm^{-1}$). Para la actividad basal de ClpB, esto es, en ausencia de sustrato, se utilizó la pendiente derivada de la adición de ATP, mientras que para la actividad ATPasa estimulada por sustrato, la pendiente la pendiente obtenida después de añadir α -caseína.

La actividad ATPasa de ClpB en presencia del sistema chaperona DnaK se midió siguiendo el protocolo descrito anteriormente, pero en presencia de DnaK 3,5 μ M, DnaJ 0,7 μ M y GrpE 0,35 μ M. La velocidad de hidrólisis del ATP de ClpB en presencia de DnaK se expresó en μ M $ATP \cdot min^{-1}$.

3. RESULTADOS

3.1. Efecto de la incorporación de subunidades mutantes inactivas en la actividad ATPasa de ClpB

Se estudió el efecto de la incorporación de cantidades crecientes de subunidades mutantes TT, TTΔN y TTΔM en la actividad ATPasa del hexámero ClpB. Para ello se mezclaron oligómeros silvestres y mutantes en las relaciones molares 6:0, 5:1, 4:2, 3:3, 2:4, 1:5 y 0:6 y se determinó su actividad ATPasa en ausencia (basal) y en presencia del sustrato modelo α -caseína (Figura 5).

Como control, se comprobó que la α -caseína estimulaba la actividad ATPasa de ClpB silvestre aproximadamente dos veces y que ninguno de los homohexámeros mutantes tiene actividad ATPasa. Cabe recordar que las variantes Trap de ClpB no hidrolizan ATP, por lo que la actividad ATPasa de las especies híbridas ClpB WT: ClpB mutante se deberá exclusivamente a la actividad de las subunidades silvestres.

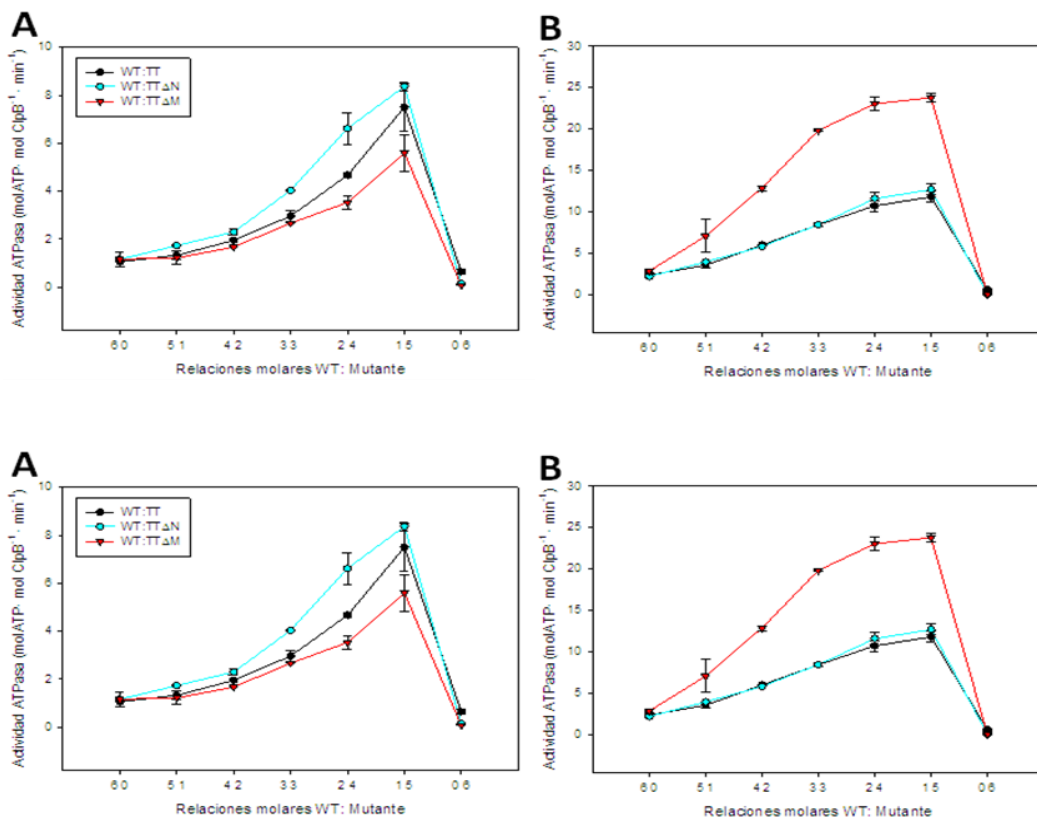


Figura 5. Actividad ATPasa de los hexámeros híbridos de ClpB. (A) Actividad basal de los hexámeros híbridos ClpB WT: ClpB TT (negro), ClpB WT: ClpB TTΔN (azul) y ClpB WT: ClpB TTΔM (rojo). (B) Actividad ATPasa estimulada por la presencia de α -caseína de los hexámeros híbridos ClpB WT: ClpB TT (negro), ClpB WT: ClpB TTΔN (azul) y ClpB WT: ClpB TTΔM (rojo). La actividad ATPasa se expresa en moles ATP · mol ClpB⁻¹ · min⁻¹.

En todos los casos, a medida que la presencia de subunidades mutantes aumentaba en el hexámero, tanto la actividad ATPasa basal como la estimulada por el sustrato α -caseína aumentan, alcanzando el valor máximo a relaciones molares 1:5 (Figura 5). Este aumento es exponencial y distinto del esperable (lineal) si cada subunidad se comportara de forma independiente del resto de subunidades. Este hecho indica que en el hexámero de ClpB existe comunicación entre distintos monómeros y que la inserción de subunidades TT inactivas modifica esta comunicación. Sin embargo, la magnitud de la hiperestimulación de la actividad ATPasa no es igual para los tres tipos de híbridos.

Por un lado, el incremento de la actividad ATPasa basal y estimulada por α -caseína fue muy similar para los hexámeros híbridos formados por protómeros silvestres y mutantes TT o TT Δ N. Esto indica que el dominio N-terminal no tiene un papel regulador de la actividad ATPasa de ClpB. Por el contrario, la actividad ATPasa estimulada por el sustrato de ClpB WT: ClpB TT Δ M sufrió un incremento dos veces mayor que el que se obtiene con otros dos mutantes (Figura 5B). Estos resultados sugieren que el dominio M regula la actividad ATPasa de ClpB, posiblemente, mediando la comunicación entre los monómeros durante el ciclo de hidrólisis del ATP y especialmente en presencia de sustrato. Con el fin de comprobarlo, se diseñó un nuevo híbrido formado por monómeros activos Δ M y monómeros TT (Figura 6).

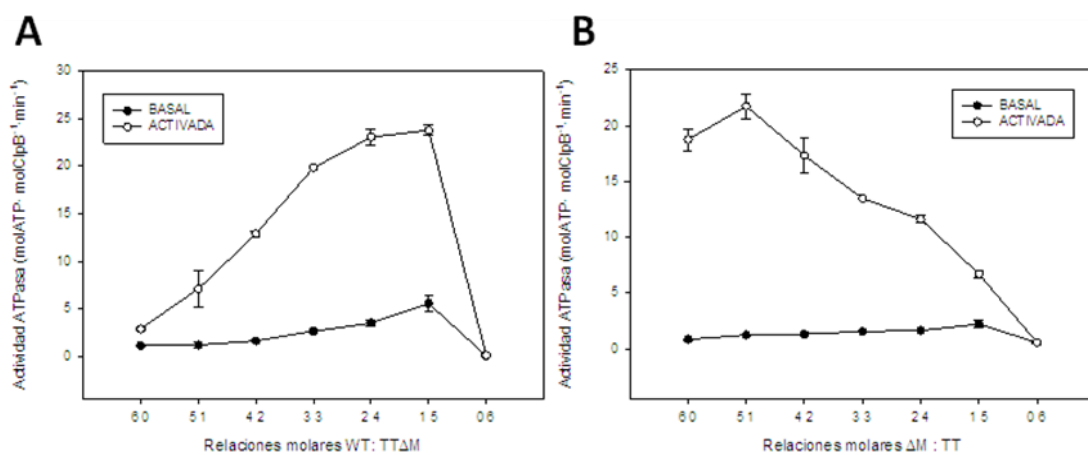


Figura 6. Actividad ATPasa del hexámero híbrido (A) WT: TT Δ M y (B) Δ M: TT. Se muestra la actividad ATPasa basal (círculos negros) y activada por sustrato (círculos blancos).

Mientras que las subunidades Δ M pueden hidrolizar ATP, los protómeros Trap, no, pero mantienen el dominio M. Si esta estructura fuera un componente regulador de la actividad ATPasa de la chaperona, la inserción de subunidades TT en un hexámero sin dominio M debería regular la actividad ATPasa de ClpB Δ M. Efectivamente, la inserción de subunidades TT y, por tanto, de dominios M en el hexámero produjo una disminución de la hiperestimulación provocada por la falta de dominios M (Figura 6B). De nuevo, este efecto regulador es más significativo en presencia de la α -caseína. Se descarta la posibilidad de que la actividad ATPasa de los heterohexámeros se reduzca por la presencia

de protómeros inactivos ya que los distintos híbridos contienen la misma concentración de monómeros activos.

3.2. Efecto de la presencia del sistema DnaK en la actividad ATPasa de ClpB

A continuación, se repitieron los ensayos de actividad ATPasa de los tres tipos de híbridos en presencia del sistema DnaK para analizar el efecto que tiene en el ciclo funcional de ClpB.

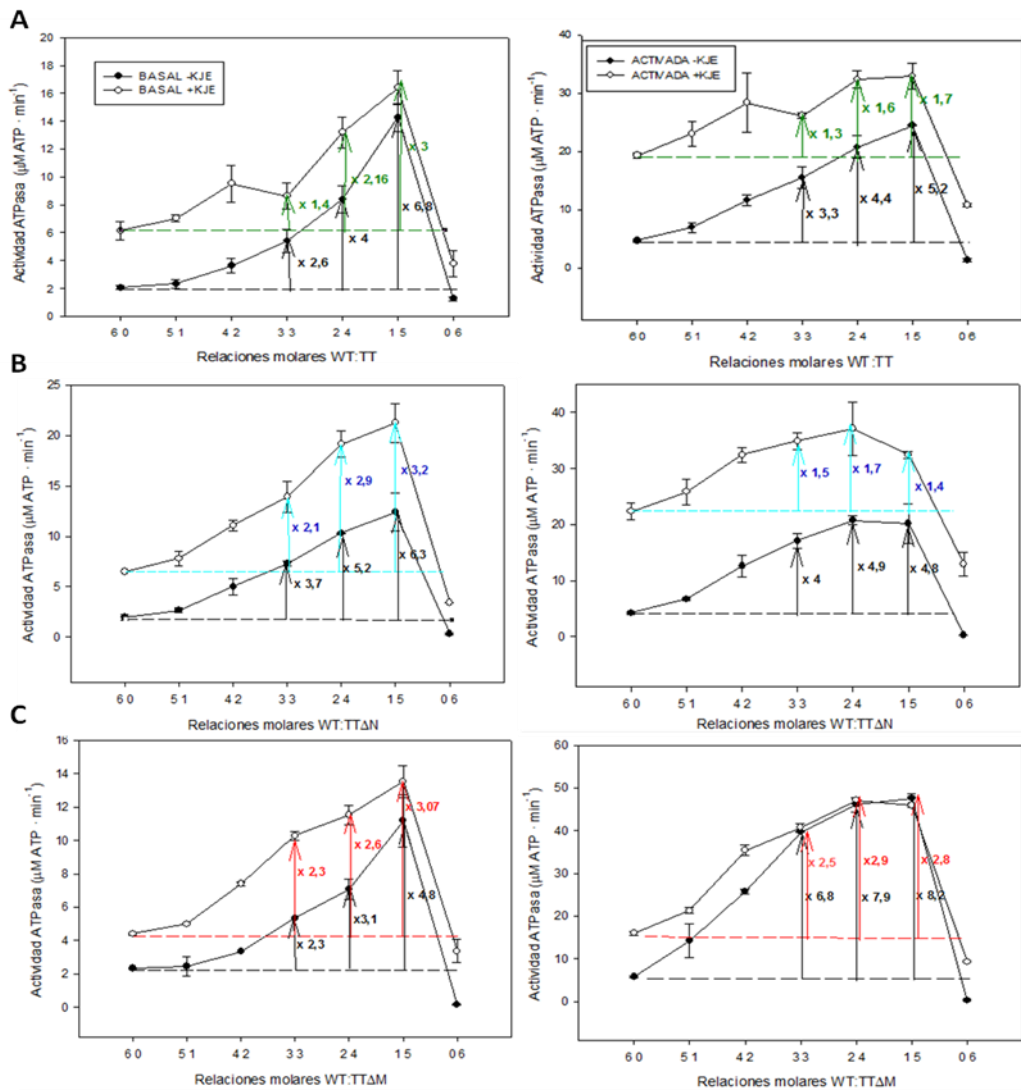


Figura 7. Comparación de la actividad ATPasa basal (izquierda) y estimulada por sustrato (derecha) de los híbridos de ClpB (A) WT: TT, (B) WT: TTΔN y (C) WT: TTΔM en ausencia (círculos negros) y presencia (círculos blancos) del sistema DnaK. La actividad ATPasa se expresa en $\mu\text{M ATP} \cdot \text{min}^{-1}$. Se representa el factor de activación asociado a la inserción de subunidades mutantes en ClpB, en ausencia (flechas negras) y presencia (flechas de colores) del sistema DnaK.

Se observó que para los tres tipos de híbridos, la presencia de DnaK reduce la hiperestimulación que provoca la inserción de las subunidades mutantes en proporciones muy parecidas (Figura 7). La presencia del sistema DnaK junto con DnaJ y GrpE reduce aproximadamente dos veces la activación de la actividad ATPasa basal de los heterohexámeros y 3 veces, la estimulada por α -caseína. Estos

resultados indican que la presencia del sistema DnaK en el medio modula la actividad ATPasa de ClpB, sobre todo, en presencia del sustrato α -caseína.

Por último, se comparó la actividad ATPasa de ClpB obtenida experimentalmente en presencia del sistema DnaK, con la actividad teórica. El valor teórico se calcula mediante la suma de la actividad ATPasa basal o estimulada por sustrato de ClpB y de DnaK, por separado. Se observó que la actividad ATPasa experimental de la mezcla ClpB (6:0) y el sistema DnaK era superior a la suma de ambas por separado (Figura 8), lo que sugiere que el acoplamiento de sus ciclos hidrolíticos producen una activación que podría ser necesaria para proporcionar la fuerza mecánica necesaria para extraer monómeros desplegados del agregado proteico.

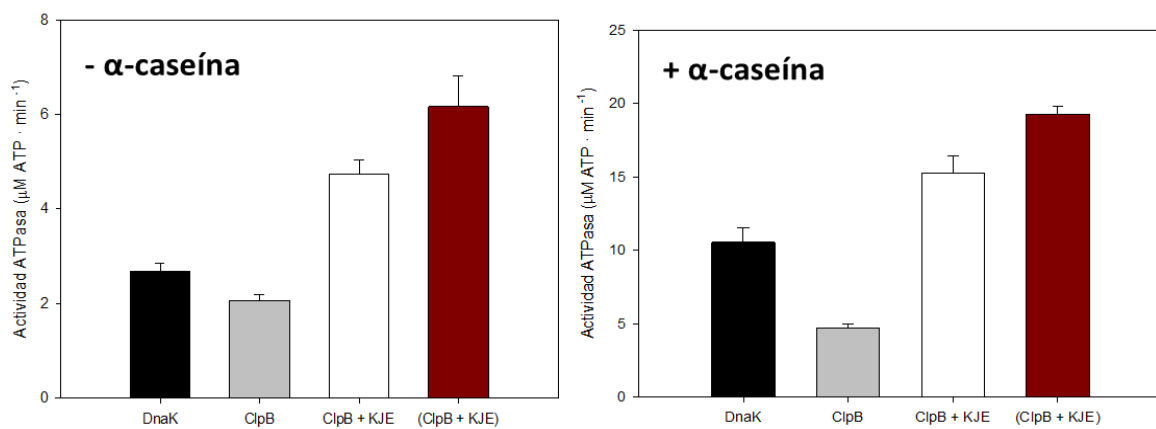


Figura 8. Efecto sinérgico del sistema DnaK en la actividad ATPasa basal (izquierda) y estimulada por sustrato (derecha) de ClpB wt. Actividad ATPasa de DnaK (negro), ClpB (gris), suma de las actividades independientes de ClpB y del sistema DnaK (blanco), y la obtenida experimentalmente para la mezcla de ambas chaperonas en las mismas condiciones experimentales (rojo oscuro).

4. DISCUSIÓN

Las proteínas Hsp100 son un componente central del sistema de control de calidad proteico de las células. ClpB de *E.coli* y su homólogo de levaduras Hsp104 son dos chaperonas moleculares pertenecientes a esta familia de proteínas, encargadas de desagregar y reactivar agregados proteicos. Esta habilidad de reactivar agregados requiere de la cooperación con las chaperonas Hsp70 (DnaK) y Hsp40 (DnaJ); en concreto, ClpB colabora con DnaK, DnaJ y GrpE para reactivar agregados estables. Todo ello convierte a ClpB en una diana de estudio importante desde el punto de vista del plegamiento y la agregación proteica.

Del Castillo y cols. (2010) describieron que la actividad desagregasa de ClpB desaparecía mediante la inserción de una subunidad inactiva, Trap, en el hexámero. Una posible interpretación es que la actividad ATPasa del híbrido fuera menor en presencia de subunidades inactivas pero tal y como

en este trabajo también se ha demostrado (Figura 5), la hidrólisis del ATP de los híbridos es superior a la del homohexámero silvestre. Además, dicha estimulación no es lineal sino exponencial, lo que indica que existe una comunicación alostérica entre monómeros que varía con la inserción de subunidades TT, posiblemente porque los cambios conformacionales que regulan dicha comunicación entre subunidades de ClpB no ocurran. No obstante, no queda claro qué dominios de la proteína son responsables de esta comunicación intermonomérica y por ello, en este trabajo se han diseñado mutantes inactivos en los que se ha eliminado alguno de los dominios flexibles (N o M) de la proteína.

El dominio N es un dominio móvil de ClpB encargado de la interacción de ClpB con sustratos agregados. Sin embargo, el dominio N terminal no regula el ciclo de hidrólisis del ATP. La inserción de subunidades inactivas carentes de dominio N estimula la actividad ATPasa de las subunidades silvestres, pero en proporciones similares a la del heterohexámero que contiene subunidades TT (Figura 5). Por lo tanto, el dominio N no parece tener un papel regulador en la actividad ATPasa de ClpB.

Una situación diferente se observa cuando se estudia el efecto de la inserción de subunidades TT Δ M en ClpB. Su inserción también hiperestimula la actividad ATPasa del híbrido, pero de una forma distinta a los otros dos mutantes, ya que es dos veces mayor en el caso de la actividad estimulada por α -caseína (Figura 6A). De forma análoga, la adición de dominios M en un hexámero ClpB Δ M con actividad ATPasa hiperestimulada, reduce dicha desregulación (Figura 6B). Estos datos identifican al dominio M como el elemento estructural que media la comunicación intermonomérica de ClpB, sobre todo en presencia de sustrato, de manera que no es suficiente con que cada protómero contenga su dominio M, sino que necesitan del dominio M de la subunidad adyacente para funcionar correctamente. El dominio M es un dominio muy flexible de la proteína y se encuentra insertado dentro del dominio NBD1 de los protómeros. Dicha disposición podría permitir la transformación de los cambios conformacionales inducidos por nucleótido en la fuerza mecánica requerida para la extracción de monómeros desplegados de los agregados proteicos.

Recientemente se ha observado que el dominio M mantiene una interacción *head-to-tail* con los NBDs del protómero adyacente, reprimiendo su actividad. Así, en la conformación reprimida de la chaperona, el dominio M se dispone de forma radial alrededor del hexámero, uniendo el NBD1 adyacente mediante su motivo 1 y el NBD2 intramonomérico, con el motivo 2. Variantes mutantes de ClpB con actividad ATPasa y desagregasa hiperestimulada mostraron una orientación del dominio M diferente, de tal forma que se rompía la interacción intramonomérica con el NBD2 (Carroni y cols., 2014). Este hecho sugiere que el dominio M media la comunicación entre los NBD de las subunidades de ClpB durante el ciclo funcional de la chaperona modificando su orientación.

Por otro lado, nos planteamos en este proyecto cuál podría ser el efecto de DnaK en la actividad ATPasa de ClpB y de los hexámeros híbridos descritos. En general, ClpB varía el mecanismo de utilización del ATP en presencia del sistema DnaK. Éste regula la actividad ATPasa de ClpB, ya que reduce la hiperactivación, tanto basal como activada por α -caseína, derivada de la inserción de subunidades mutantes en todos los híbridos (Figura 7). Sin embargo, la desregulación de la actividad ATPasa estimulada por sustrato de WT:TT Δ M sigue siendo dos veces superior a la de los otros dos híbridos. Este resultado vuelve a resaltar la función reguladora del dominio M sobre la actividad ATPasa de ClpB, especialmente en presencia de sustrato.

Asimismo, la hiperestimulación de la actividad ATPasa de ClpB en presencia de DnaK se debe a la cooperación sinérgica que se mantiene entre ambas chaperonas (figura 8). La actividad ATPasa tanto basal como activada por sustrato observada del ClpB es superior que la suma de las actividades de ClpB y DnaK por separado. Este efecto sinérgico en la actividad de ClpB explica por qué ambas chaperonas colaboran para la desagregación de agregados proteicos. DnaK interacciona con ClpB y estimula su actividad hidrolítica para facilitar la reactivación de agregados estables, que el sistema DnaK por sí sólo no puede reactivar. Recientemente se ha propuesto que dicha interacción se produce entre el dominio M de ClpB y el dominio NBD de DnaK (Seyffer y cols., 2012; Rosenzweig y cols., 2013; De Santis y cols., 2014).

En resumen, estos resultados indican que el dominio M regula el ciclo de hidrólisis del ATP mediante la comunicación entre los NBDs de monómeros adyacentes, posiblemente mediante modificaciones de su orientación. Además, es una estructura necesaria para la cooperación de ClpB con DnaK, puesto que DnaK regula el ciclo ATPasa del hexámero, probablemente mediante la interacción con dicho dominio.

5. CONCLUSIONES

1. El dominio M de ClpB es el elemento regulador de la actividad ATPasa de ClpB, especialmente en presencia de sustrato. Su ausencia hiperestimula la hidrólisis de ATP de forma más significativa que la ausencia del otro dominio flexible de la proteína, el dominio N. Esto demuestra que el dominio M es responsable de la comunicación intermonomérica que regula el ciclo funcional del hexámero.

2. El dominio M está también implicado en la interacción de DnaK y ClpB. Esta interacción estimula la actividad ATPasa del sistema bichaperona. El acoplamiento de los ciclos hidrolíticos de

ambas chaperonas, mediado por el dominio M, es necesario para extraer eficazmente monómeros desplegados de agregados estables.

La terminación de este proyecto requiere repetir los ensayos de la actividad ATPasa de ClpB en presencia del sistema DnaK con el objetivo de confirmar que el dominio M es el responsable de la regulación que DnaK ejerce sobre el hexámero de ClpB.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Acebron, S. P., Martin, I., del Castillo, U., Moro, F., & Muga, A. (2009). DnaK-mediated association of ClpB to protein aggregates. A chaperone network at the aggregate surface. *FEBS Letters*, 583(18), 2991-2996.
2. Barnett, M. E., Nagy, M., Kedzierska, S., & Zolkiewski, M. (2005). The amino-terminal domain of ClpB supports binding to strongly aggregated proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34940-34945.
3. Carroni, M., Kummer, E., Oguchi, Y., Wendler, P., Clare, D. K., Sinning, I., et al. (2014). Head-to-tail interactions of the coiled-coil domains regulate ClpB activity and cooperation with Hsp70 in protein disaggregation. *Elife*, 3, e02481.
4. Chow, I. T., & Baneyx, F. (2005). Coordinated synthesis of the two ClpB isoforms improves the ability of escherichia coli to survive thermal stress. *FEBS Letters*, 579(20), 4235-4241.
5. del Castillo, U., Alfonso, C., Acebron, S. P., Martos, A., Moro, F., Rivas, G., et al. (2011). A quantitative analysis of the effect of nucleotides and the M domain on the association equilibrium of ClpB. *Biochemistry*, 50(12), 1991-2003.
6. del Castillo, U., Fernandez-Higuero, J. A., Perez-Acebron, S., Moro, F., & Muga, A. (2010). Nucleotide utilization requirements that render ClpB active as a chaperone. *FEBS Letters*, 584(5), 929-934.
7. Doyle, S. M., Genest, O., & Wickner, S. (2013). Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, 14(10), 617-629.
8. Doyle, S. M., & Wickner, S. (2009). Hsp104 and ClpB: Protein disaggregating machines. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(1), 40-48.
9. Fernandez-Higuero, J. A., Acebron, S. P., Taneva, S. G., Del Castillo, U., Moro, F., & Muga, A. (2011). Allosteric communication between the nucleotide binding domains of caseinolytic peptidase B. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 25547-25555.
10. Lee, S., Sowa, M. E., Watanabe, Y. H., Sigler, P. B., Chiu, W., Yoshida, M., et al. (2003). The structure of ClpB: A molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell*, 115(2), 229-240.
11. Mogk, A., Schlieker, C., Strub, C., Rist, W., Weibezahn, J., & Bukau, B. (2003). Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 17615-17624.
12. Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Langen, H., et al. (1999). Identification of thermolabile escherichia coli proteins: Prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *The EMBO Journal*, 18(24), 6934-6949.
13. Nagy, M., Guenther, I., Akoyev, V., Barnett, M. E., Zavodszky, M. I., Kedzierska-Mieszkowska, S., et al. (2010). Synergistic cooperation between two ClpB isoforms in aggregate reactivation. *Journal of Molecular Biology*, 396(3), 697-707.
14. Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A., & Lindquist, S. (1994). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*, 372(6505), 475-478.
15. Rosenzweig, R., Moradi, S., Zarrine-Afsar, A., Glover, J. R., & Kay, L. E. (2013). Unraveling the mechanism of protein disaggregation through a ClpB-DnaK interaction. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6123), 1080-1083.
16. Sanchez, Y., & Lindquist, S. L. (1990). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4959), 1112-1115.

- 17.** Seyffer, F., Kummer, E., Oguchi, Y., Winkler, J., Kumar, M., Zahn, R., et al. (2012). Hsp70 proteins bind Hsp100 regulatory M domains to activate AAA+ disaggregase at aggregate surfaces. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(12), 1347-1355.
- 18.** Zhang, T., Ploetz, E. A., Nagy, M., Doyle, S. M., Wickner, S., Smith, P. E., et al. (2012). Flexible connection of the N-terminal domain in ClpB modulates substrate binding and the aggregate reactivation efficiency. *Proteins*, *80*(12), 2758-2768.