



---

Trabajo Fin de Grado  
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

---

# Clonaje, expresión y caracterización funcional de Hsp105 $\alpha$ , un componente de la desagregasa humana

Autor:

**Aritz Roa Eguiara**

Director:

**Dr. Fernando Moro Pérez**

Co-Director:

**Dr. Arturo Muga Villate**

---

## Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. CHAPERONAS MOLECULARES Y AGREGACIÓN PROTEICA	1
1.1 SISTEMA DESAGREGASA HUMANO	1
1.2 Hsp105	2
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>3</b>
3.1 CLONAJE	3
3.1.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ( <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i> , PCR)	3
3.1.2 VECTOR DE EXPRESIÓN	3
3.1.3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	3
3.2 PURIFICACIÓN	4
3.2.1 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN	4
3.2.2 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN	4
3.2.3 HIDRÓLISIS DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN CON ULP1	5
3.2.4 PURIFICACIÓN DE HSP105 $\alpha$	5
3.3 CARACTERIZACIÓN DE ACTIVIDAD DE Hsp105 $\alpha$	5
3.3.1 MEDIDAS DE ACTIVIDAD ATPASA	5
3.3.2 REACTIVACIÓN DE AGREGADOS DE G6PDH	5
3.4 PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA	6
3.4.1 ALINEAMIENTOS DE SECUENCIAS	6
3.4.2 MODELADO POR HOMOLOGÍA	6
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>6</b>
4.1 CLONAJE DE LA PROTEÍNA	6
4.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN	7
4.3 CORTE PROTEICO CON ULP1	8
4.4 PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HSP105 $\alpha$	8
4.5 MEDIDAS DE ACTIVIDAD ATPASA	9
4.6 CAPACIDAD DE REACTIVACIÓN DE AGREGADOS	10
4.7 PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA PROTEICA DE APG2 Y Hsp105 $\alpha$ .	10
4.8 PREDICCIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN Y CORTE CON ULP1	11
<b>5 DISCUSIÓN</b>	<b>12</b>
<b>6 CONCLUSIÓN</b>	<b>14</b>

<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>15</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>16</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>17</b>
<b>ANEXO C</b>	<b>19</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Chaperonas moleculares y agregación proteica

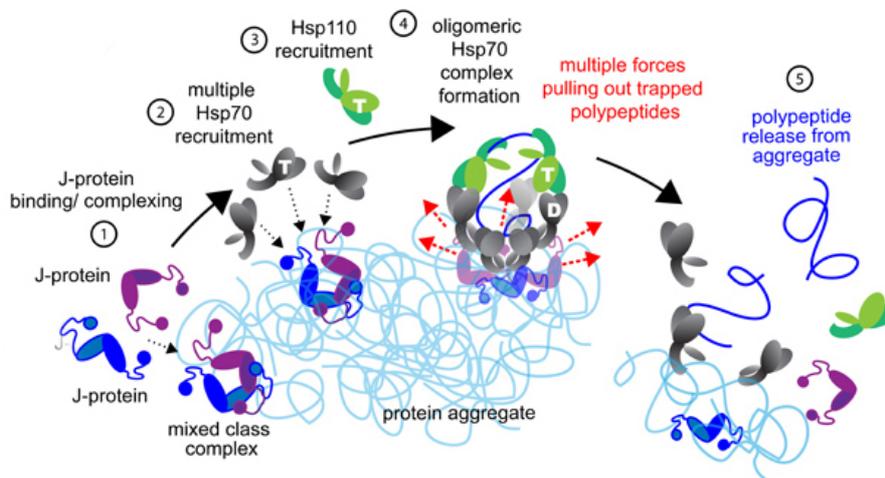
Las proteínas han de alcanzar una estructura tridimensional concreta una vez sintetizadas. Esta conformación se encuentra codificada en su secuencia de aminoácidos, sin embargo durante el proceso de plegamiento, importación a los orgánulos o las cada vez más relevantes proteínas de naturaleza lábil, los polipéptidos pueden exponer regiones hidrofóbicas al disolvente. Esto conlleva posibles interacciones intermoleculares entre monómeros que dan lugar a la formación de agregados proteicos. En concreto, *in vivo* originan ovillos, protofibrillas y amiloides extracelulares, todos ellos enriquecidos en hojas- $\beta$ <sup>1</sup>. Los estados intermedios desordenados de estos agregados resultan en las especies más tóxicas, causando estrés oxidativo, apoptosis y pérdida de tejido en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington o Parkinson y en el proceso de envejecimiento<sup>2</sup>. Cabe destacar que la flexibilidad de las proteínas las hace marginalmente estables en el estado fisiológico, de forma que en situaciones de estrés como el térmico, metabólico o iónico se incrementa la fragilidad celular. Por ello, el mantenimiento de la homeostasis proteica o proteostasis, es esencial. Con este objetivo, las células han desarrollado una compleja red de proteínas que actúa como una maquinaria de control de calidad. Estas son las chaperonas y las proteasas, que colaboran con los mecanismos de autofagia y secreción de agregados.

Las chaperonas moleculares asisten los procesos de plegamiento y maduración de numerosas proteínas, además de prevenir su agregación y colaborar en la degradación de las que no se pliegan de manera estable<sup>3</sup>. Si la agregación resulta inevitable, pueden reactivarlas con el esfuerzo combinado de las desagregasas Hsp104 (proteína de choque térmico de 104 kDa) en eucariotas inferiores y ClpB (*Caseinolytic Peptidase B*) en procariontes, en colaboración con su correspondiente sistema Hsp70 en un sistema dependiente de ATP. En eucariotas superiores también se ha observado un sistema desagregasa a pesar de la ausencia de homólogos de Hsp104 y ClpB, por lo que la actividad recae principalmente sobre Hsc70. Esta, a su vez, colabora con proteínas de la familia Hsp40 (DnaJ), como es DnaJB1, y miembros de la familia Hsp110 como son Apg2 y Hsp105<sup>4</sup>.

### 1.1 Sistema desagregasa humano

El eje principal del sistema desagregasa humano (**Fig. 1**) son las Hsp70. Su estructura consiste en un dominio N-terminal capaz de unir e hidrolizar ATP (*Nucleotide Binding Domain*, NBD) y un dominio C-terminal que interacciona con el sustrato proteico (*Substrate Binding Domain*, SBD), unidos por un conector conservado<sup>5</sup>. Estas chaperonas realizan ciclos de unión y liberación del sustrato, gobernados por los eventos de unión e hidrólisis de ATP. Uno de los miembros de esta familia en humanos es Hsc70 (HspA8), de carácter constitutivo y considerado como un factor esencial en el mantenimiento celular<sup>6</sup>. Se encuentra tanto en el citosol como en el núcleo<sup>7</sup> y está ampliamente involucrada en los procesos celulares<sup>5</sup>. Por otro lado, DnaJB1 (DnaJB1), una co-chaperona Hsp40 de dominio J, participa en la unión y transferencia de sustratos a las Hsp70, confiriendo selectividad por los sustratos a la vez que promueve su actividad ATPasa<sup>6</sup>. Posee también expresión constitutiva y prevalece entre las Hsp40 en situaciones de choque térmico.

El tercer componente del sistema desagregasa humano es un representante de la familia Hsp110, entre las que destacan las proteínas Apg2 (HspH2) y dos isoformas de Hsp105 (HspH1),  $\alpha$  y  $\beta$ . Actúan como factores de intercambio de nucleótidos (*Nucleotide Exchange Factor*, NEF) de Hsp70, promoviendo el intercambio de ADP por ATP, y son esenciales en la reactivación y solubilización de los agregados proteicos. Presentan similitudes estructurales con las Hsp70, como la presencia de dominios NBD y SBD.



**Figura 1. Modelo mecánico de desagregación proteica de metazoos basado en Hsp70.** Modelo del mecanismo desagregasa del sistema Hsp70 (gris), proteína-J/DnaJ (morado y azul) y Hsp110 (verde). Los estados nucleotídicos de los NBD se indican con D y T para la unión a ADP y ATP, respectivamente. (1) Las proteínas-J identifican como blanco los agregados proteicos, (2) reclutan a Hsp70 y estimulan la hidrólisis de ATP, (3) se forma el heterodímero Hsp70-Hsp110 enfrentando los dominios NBD, (4) se ensambla el complejo y genera la fuerza necesaria para la extracción del péptido, (5) las Hsp110 propician la liberación del péptido por Hsp70 (figura tomada de Nillegoda y Bukau, 2015)<sup>8</sup>.

## 1.2 Hsp105

Las Hsp110s son indispensables para una actividad desagregasa eficiente<sup>4,6</sup>, lo que requiere su expresión constitutiva, como es el caso de Hsp105 $\alpha$ . A su vez, Hsp105 $\beta$  se expresa tras un choque térmico a 42 °C. La isoforma  $\alpha$  se encuentra principalmente en el citoplasma, mientras que la  $\beta$  se importa al núcleo. Esta diferencia corresponde a la distinta accesibilidad de la secuencia de importación al núcleo de cada isoforma<sup>9</sup>. Hasta la fecha, la principal función de estas proteínas se ha asociado con su actividad como NEF de Hsp70, impulsando el ciclo del sistema desagregasa. A pesar de todo, la finalidad de la propia actividad ATPasa de las Hsp110s es aún una incógnita. Se ha descrito la capacidad de Apg2 y Hsp105 para unirse a sustratos y prevenir su agregación, así como la co-localización celular de estas proteínas con agregados proteicos<sup>4</sup>. En este punto, permanece la duda de si puede interactuar con agregados de manera independiente de las Hsp70 o si su función radica en el reclutamiento de estas chaperonas. Cabe destacar que el dominio SBD de Hsp105 es necesario para la unión de determinados sustratos y su preservación en el estado plegado<sup>6</sup>, por lo tanto la relevancia de estos dominios va más allá de la estimulación del sistema desagregasa dependiente de Hsp70. A nivel clínico, la sobreexpresión de Hsp105 se ha relacionado con la agresividad de diversos tumores, entre los que destaca el desarrollo de linfoma por la interacción directa con Bcl-6 y c-Myc<sup>10</sup>. Debido a la trascendencia del sistema desagregasa en las múltiples patologías y funciones celulares mencionadas, comprender los mecanismos subyacentes a estas actividades puede suponer avances clínicos relevantes.

## 2 OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo fue caracterizar la actividad de la Hsp105 $\alpha$  humana. Para cumplirlo fue necesario:

- Expresar y purificar la proteína Hsp105 $\alpha$ .
- Estudiar sus actividades ATPasa y reactivadora de agregados proteicos.

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos químicos empleados, como tris(hidroximetil)aminometano, agarosa, imidazol, NaCl, KOH, etc., se obtuvieron en el mayor grado de pureza posible de casas comerciales como VWR, Merk o Thermo Fisher.

Las composiciones de los tampones no referenciados se encuentran en el **Anexo A**.

Las proteínas Apg2, DnaJB1, Hsc70, Ulp1 se obtuvieron del grupo de investigación.

### 3.1 CLONAJE

#### 3.1.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)

La PCR se empleó para amplificar la secuencia de ADN de Hsp105 $\alpha$  contenida en el plásmido pcDNA5/FRT/TO-GFP (Addgene). Los cebadores se diseñaron mediante la herramienta “Primer Blast” (NCBI)<sup>11</sup>. La reacción se llevó a cabo en disolución con dNTPs (250  $\mu$ M), cebadores (1  $\mu$ M), polimerasa Pfu (Agilent) (2,5 U) y ADN molde (100 ng/ $\mu$ l), utilizando un termociclador “Mastercycler Gradient” (Eppendorf). Se comenzó desnaturalizando las hebras de ADN (3 min, 94  $^{\circ}$ C) y se emplearon 30 ciclos de: desnaturalización (30 segundos, 94  $^{\circ}$ C), hibridación (30 segundos, 58  $^{\circ}$ C) y reacción de extensión de las hebras (5 minutos, 72  $^{\circ}$ C). Se finalizó con un tiempo añadido de extensión (10 min, 72  $^{\circ}$ C).

#### 3.1.2 Vector de expresión

El producto de PCR se analizó por electroforesis de ADN (80 mV, 45 min) en gel de agarosa (2% p/v) en tampón TAE y 3  $\mu$ l SYBR-Safe (Invitrogen) por cada 20 ml de gel. Se purificó empleando el “Protocolo de Limpieza de PCR” del kit “Nucleospin<sup>TM</sup> Gel & PCR clean-up” (Macherey-Nagel). Se digirieron el producto de PCR y el plásmido pE-SUMO (LifeSensors). Para la purificación por extracción de banda de los fragmentos se empleó el protocolo “Extracción de gel” del kit “Nucleospin<sup>TM</sup> Gel & PCR clean-up” (Macherey-Nagel).

El plásmido pE-SUMO posee una región de clonaje múltiple para las enzimas de restricción, donde se introduce la secuencia del gen de interés para dar lugar a la proteína de fusión recombinante que en su N-terminal contiene una etiqueta de 6 histidinas, para la purificación en cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC) y la secuencia de la proteína SUMO (Smt3) que se une al gen de interés con la secuencia de corte de la proteasa específica de SUMO, Ulp1, (Gly-Gly-X). De esta forma tras la purificación se puede obtener la proteína natural sin aminoácidos añadidos.

#### 3.1.3 Transformación de células competentes

Para la ligación se emplearon 35 ng/ $\mu$ l de plásmido y 65 ng/ $\mu$ l de inserto, relación molar plásmido:inserto de 1:3, en presencia de T4-ADN ligasa (NEB) con el tampón de T4-ADN ligasa en un volumen final de 10  $\mu$ l

durante la noche a 37 °C. Se empleó 1 µl del producto de ligación para transformar 50 µl de células de *E. coli* DH5α electrocompetentes, cepa empleada para el mantenimiento de plásmidos, mediante electroporación. Se utilizó 1 µl de plásmido recombinante para transformar 50 µl de células. Se les aplicó un pulso de 2,5 mV en el electroporador (Gene Pulse Xcel, BioRad) e inmediatamente se añadió 1 ml de medio Luria-Bertani (LB) Broth (Conda) frío seguido de 10 min a 4 °C. Se sembraron en placas de LB Agar (Conda) suplementado con ampicilina (100 µg/ml), y se incubaron a 37 °C durante la noche. Las colonias seleccionadas crecieron durante una noche en medio LB Broth con ampicilina, y se centrifugaron para purificar el plásmido siguiendo el protocolo de purificación de ADN para plásmidos de alta copia (Nucleospin<sup>TM</sup> Plasmid, Macherey-Nagel). El análisis de las colonias se realizó por electroforesis en gel de agarosa 2% p/v como se ha indicado previamente (3.1.2).

Los plásmidos recombinantes seleccionados fueron empleados para transformar células de *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus electrocompetentes, cepa que se utilizó para la expresión de la Hsp105α, vía electroporación como se ha descrito anteriormente. Se sembraron en LB Agar suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (35µg/ml). La obtención de colonias positivas se realizó como se ha descrito para DH5α.

## **3.2 PURIFICACIÓN**

### **3.2.1 Expresión de la proteína de fusión**

Las células *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus transformadas crecieron en 25 ml de medio (300 rpm, 14 h, 37 °C). Se inocularon 600 ml de medio LB Broth fresco con 1 ml de cultivo saturado y se incubó hasta que alcanzó una OD<sub>600</sub> de 0,6. La sobreexpresión de la proteína se indujo añadiendo 0,1 mM de isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) y 0,3 M de NaCl, para evitar la agregación de Hsp105α, y se incubó el cultivo 22 horas a 20 °C. Las células se recogieron por centrifugación (13500 rpm, 10 min, 4 °C) y se resuspendieron en 50 ml de tampón de lisis.

### **3.2.2 Purificación de la proteína de fusión**

Las células se lisaron con un emisor de ultrasonidos Soniprep 150 (MSE) con sonda de titanio. Se realizaron 5 ciclos de 20 segundos a 10 mA con intervalos de 30 segundos de enfriamiento entre pulsos, repitiendo el proceso 2 veces continuamente en baño con hielo. La fracción soluble se cargó en una columna de 10 ml de resina IMAC (Ni<sup>+</sup>-NTA) de “GE Healthcare”. La resina hidrofílica posee el catión divalente Ni<sup>2+</sup>, de forma que actúa como quelante para las etiquetas de histidina, dando lugar a una cromatografía de afinidad que permite la purificación de las proteínas diana etiquetadas.

La resina se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón de unión (A<sub>1</sub>). Se cargó el sobrenadante y se lavó con 3 volúmenes de A<sub>1</sub> y 3 volúmenes de tampón de lavado (A<sub>2</sub>), en el que se incrementó la fuerza iónica con 1 M NaCl. Se lavó de nuevo con 4 volúmenes de A<sub>1</sub> y la proteína se eluyó con 6 volúmenes de tampón de elución (B). La proteína se recogió en fracciones de 5 ml y las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE (12,5%) usando geles preparados en un “MiniProtean II” (BioRad). Las fracciones que contenían la proteína se dializaron durante la noche a 4 °C contra tampón A<sub>1</sub>.

### 3.2.3 Hidrólisis de la proteína de fusión con Ulp1

Para eliminar SUMO y la cola de histidinas, la proteína de fusión se cortó con la proteasa Ulp1 marcada con una etiqueta de 6 histidinas y obtenida en el laboratorio. Se emplearon distintas relaciones molares proteína:proteasa en 50  $\mu$ l finales con tampón A<sub>1</sub> durante la noche a 4 °C. El análisis de las muestras de proteína se realizó mediante SDS-PAGE (12,5%).

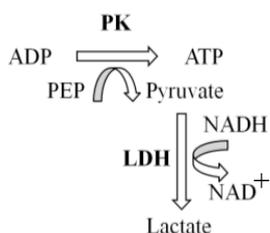
### 3.2.4 Purificación de Hsp105 $\alpha$

Tras la hidrólisis, se realizó un segundo paso de purificación utilizando la columna de Ni<sup>+</sup>-NTA. Se equilibró con 3 volúmenes de tampón A<sub>1</sub> y tras cargar la muestra esta se recogió en el mismo tampón. La proteína purificada se analizó mediante SDS-PAGE, como se ha indicado previamente y se dializó frente a tampón de diálisis (C). La proteína se concentró utilizando filtros Amicon-Ultra 50K (Milipore). La muestra concentrada se centrifugó y la concentración final se determinó mediante el método de Bradford <sup>12</sup>.

## 3.3 CARACTERIZACIÓN DE ACTIVIDAD DE Hsp105 $\alpha$

### 3.3.1 Medidas de actividad ATPasa

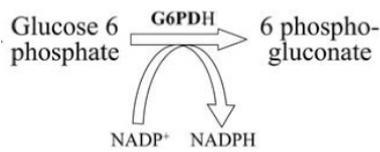
Las medidas de actividad ATPasa se llevaron a cabo a 37 °C con un lector de placas de 96 pocillos (Synergy HTX, BioRad), empleando un sistema enzimático que acopla la hidrólisis de ATP a la oxidación del NADH, que monitoriza siguiendo la disminución de absorbancia a 340 nm (**Fig. 2**). Las medidas se realizaron en tampón de reacción en presencia de distintas combinaciones de chaperonas. La reacción comenzó con la adición de 1 mM ATP y el sistema regenerador de nucleótido (2 mM PEP, 0,3 mM NADH (Roche), 0,017 mg/ml LDH, 12,5 mg/ml PK) en un volumen final de 200  $\mu$ l. La velocidad de consumo de ATP ( $\mu$ mol ATP/min) se calculó de la pendiente obtenida al analizar el descenso lineal de la absorbancia a 340 nm.



**Figura 2. Sistema acoplado para medir la actividad ATPasa.** A medida que las proteínas consumen ATP, el ADP resultante se convierte en ATP por el sistema de regeneración. El sistema consiste en los sustratos, fosfoenolpiruvato (PEP) y NADH, y los enzimas, piruvato kinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH). PK cataliza la conversión de ADP y PEP en ATP y piruvato, mientras que este último es reducido a lactato por la LDH a expensas de la oxidación de NADH. El NAD<sup>+</sup> no absorbe a 340 nm, por lo que la disminución de absorbancia del NADH está directamente relacionada con la hidrólisis de ATP.

### 3.3.2 Reactivación de agregados de G6PDH

La proteína glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, 2,5  $\mu$ M) (Sigma) se desnaturalizó (50°C, 30 min) en tampón de agregación. El sustrato agregado se diluyó hasta 0,4  $\mu$ M en tampón de actividad, en presencia de 2  $\mu$ M Hsc70, 0,5  $\mu$ M DnaJB1 y diferentes concentraciones de Hsp105 $\alpha$  o Apg2. La reactivación se estimó en tampón de reacción y se inició con la adición de 1 mM ATP y el sistema regenerador de ATP indicado anteriormente a 30 °C, monitorizando la reducción de NADP<sup>+</sup> (Roche) mediante el incremento de absorbancia a 340 nm (**Fig. 3**).



**Figura 3. Reacción de reducción de  $\text{NADP}^+$  por la G6PDH.** La extracción y replegamiento de moléculas de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) por el sistema desagregasa humano se midió analizando la reacción enzimática que se detalla. La reacción permite que la proteína catalice la reacción de oxidación de glucosa-6-fosfato en 6-P-gluconato. A su vez reduce el  $\text{NADP}^+$  y la producción de NADPH puede seguirse mediante el aumento de absorbancia a 340 nm.

### 3.4 PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA

#### 3.4.1 Alineamientos de secuencias

Los modelos tridimensionales de Hsp105 $\alpha$  se construyeron mediante modelado por homología. En primer lugar, la estructura secundaria fue predicha empleando la herramienta PSIPRED<sup>13</sup>. A continuación, se procedió a cribar la secuencia de la proteína completa empleando los servidores SWISS-MODEL<sup>14</sup> para obtener regiones de la proteína con estructura tridimensional conocida. Tras ello, los alineamientos de la secuencia molde y de Hsp105 $\alpha$  se llevaron a cabo en Clustal Omega<sup>15</sup> y Blastp<sup>16</sup>.

#### 3.4.2 Modelado por homología

Por un lado, la estructura terciaria de la proteína se construyó mediante MODELLER 9.17<sup>17</sup>. Partiendo de los alineamientos anteriormente realizados y los modelos correspondientes, el programa calcula automáticamente el nuevo modelo. Por otro lado, se empleó la herramienta I-TASSER<sup>18</sup> con el mismo fin y se compararon los resultados obtenidos con ambas herramientas. Los modelos obtenidos se sometieron a una minimización de energía mediante el servidor ModRefiner<sup>19</sup> y se analizaron mediante ERRAT<sup>20</sup> para evaluar la calidad y fiabilidad de la estructura.

Finalmente, a los modelos obtenidos se les añadió la estructura de SUMO (Smt3) co-cristalizada con el dominio C-terminal de Ulp1 (ID:1EUUV), para analizar la accesibilidad de la secuencia de corte. La manipulación y visualización de los archivos .pdb se llevó a cabo empleando el programa UCSF Chimera<sup>21</sup>.

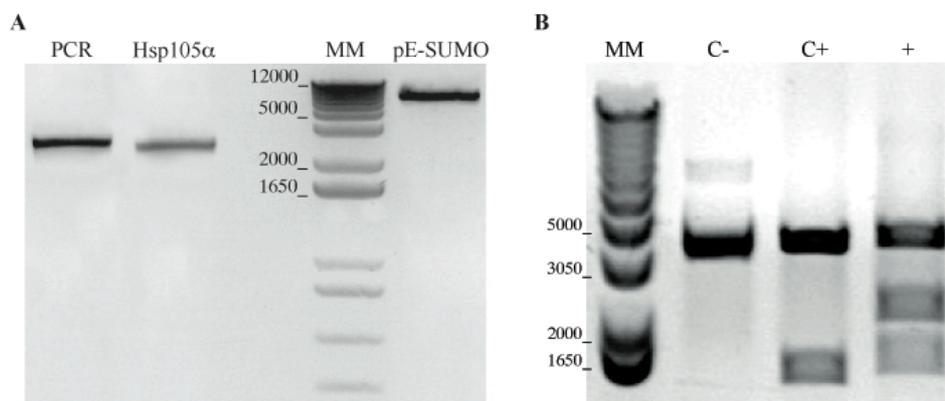
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Clonaje de la proteína

El ADN codificante de Hsp105 $\alpha$  fue amplificado por PCR como se indica en el apartado 3.1.1, dando como resultado una única banda de 2571 pares de bases (**Fig. 4A**). Los cebadores empleados contenían la secuencia de corte para la endonucleasa BsmBI con bases añadidas para propiciar la interacción con la enzima, región de complementariedad con los extremos cohesivos del plásmido pE-SUMO una vez digerido con BsaI y la región de hibridación con el ADN molde de Hsp105 $\alpha$ . El plásmido digerido presenta dos extremos cohesivos no complementarios, evitando así la religación, por lo que se debe tener en cuenta en el diseño de los cebadores. En base a ello la secuencia de los cebadores fue 5'-ATCGTCTCTAGGTATGTCGGTGGTGGGG-3' para la hebra positiva y 5'-CCCCGTCTCTCTAGACTAGTCCAAGTCCATATTAACAG-3' para la negativa (secuencia de restricción para BsmBI subrayada).

A continuación, el plásmido pE-SUMO y el producto de PCR se sometieron a digestión por endonucleasas. Para el plásmido se empleó el enzima BsaI (NEB) y para el producto BsmBI (NEB), durante 1 h a 37 y 55 °C, respectivamente.

Los productos de la digestión (**Fig. 4A**) fueron purificados de banda y empleados para la ligación, de forma que se obtuvo el plásmido recombinante. El producto de ligación correspondiente a la proteína de fusión se transformó en *E. coli* DH5 $\alpha$  (3.1.3), y se analizaron las colonias que crecieron para identificar aquellas que contenían el plásmido con el fragmento (**Fig. 4B**).



**Figura 4. Amplificación PCR de Hsp105 $\alpha$  y análisis por endonucleasa de restricción de la secuencia recombinante pE-SUMO-Hsp105 $\alpha$ .** Electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE. (A) Producto de PCR (PCR) y digestiones de Hsp105 $\alpha$  y pE-SUMO. (B) El plásmido recombinante pE-SUMO-Hsp105 $\alpha$  se identifica por la presencia de tres cortes de digestión por el enzima Pst I, dando lugar a tres fragmentos. De esta forma se identifica la colonia positiva (+); control negativo (C-) de plásmido pE-SUMO vacío sin digerir y positivo (C+) digerido. El marcador (MM) "1 kb ladder" indicado en pares de bases.

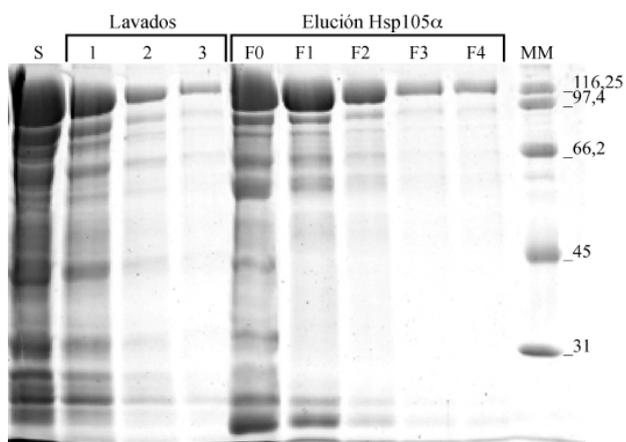
Tras la purificación del plásmido se transformó la cepa de expresión BL21(DE3)-CodonPlus (3.1.3).

#### 4.2 Expresión y purificación de la proteína de fusión

Una de las colonias positivas de BL21(DE3)-CodonPlus fue seleccionada para proceder a la expresión proteica, tal y como se indica en el apartado 3.2.1. Se empleó el protocolo de expresión de Apg2, proteína ya expresada con anterioridad en el laboratorio, por la homología entre la secuencia de ambas proteínas. Para ello, se incrementó la concentración de sal respecto al medio comúnmente empleado, ya que propicia la expresión de proteínas de gran tamaño mediante la inducción de estrés osmótico y la sobreexpresión de chaperonas bacterianas que facilitan la solubilización de la proteína diana.

Una vez el crecimiento celular alcanzó el valor óptimo, las células se recogieron por centrifugación para proceder a su lisis. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación y 150 ml de sobrenadante se cargaron en la columna IMAC para continuar con la purificación de la proteína de fusión como se indica en la sección 3.2.2. En las primeras etapas del proceso la etiqueta de histidinas interaccionó con la resina, con una concentración 10 mM imidazol que evita la mayoría de las interacciones inespecíficas. Esta situación se favoreció aumentando la fuerza iónica, mediante el incremento de 1 M de NaCl. La proteína diana se eluyó elevando la concentración 400 mM imidazol.

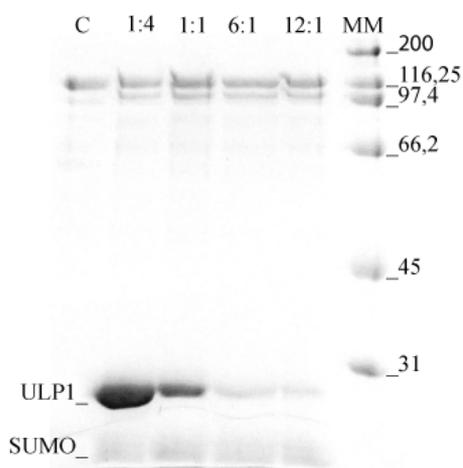
La proteína se recogió en fracciones de 5 ml para su análisis (**Fig. 5**). Desde un principio se observaron dificultades para que la proteína recombinante interaccionase con la resina, eluyendo sin interaccionar con la columna de la manera prevista. A pesar de ello, se decidió continuar con la purificación de la población que sí interaccionaba. Se seleccionaron las fracciones 1 y 2, que presentaba mayor cantidad de proteína y se dializaron para retirar el imidazol.



**Figura 5. Purificación de proteína recombinante HisTag-SUMO-Hsp105α.** Electroforesis en SDS-PAGE (12,5%) de la elución del sobrenadante (S), lavados con tampón A<sub>1</sub> (1 y 3) y A<sub>2</sub> (2), elución de la proteína de fusión con tampón B (F0-F4) y marcador de peso molecular (MM; kDa).

### 4.3 Corte proteico con Ulp1

Se empleó la proteasa específica de SUMO, Ulp1, para escindir la secuencia de Hsp105α de SUMO y la etiqueta de histidinas. Para ello se probaron distintas relaciones molares proteína:proteasa, para determinar la proporción adecuada de proteólisis de las fracciones dializadas. Se observó que independientemente de la relación molar empleada se hidrolizaba aproximadamente un 51% de la proteína de fusión, dando lugar a una nueva banda de 96 kDa con el tamaño esperado de Hsp105α (**Fig. 6**). Además se aprecia la presencia de Ulp1 (31 kDa) y SUMO, que migra con una masa molecular aparente de 20 kDa. En base a este resultado se decidió proteolizar la mezcla de las fracciones 1 y 2 con 30 μM de Ulp1.



**Figura 6. Ensayo de corte con Ulp1.** Se emplearon distintas relaciones molares proteína:proteasa para la escisión de la proteína de fusión, como se indica sobre cada calle. Se incluyó un control de proteína recombinante sin tratar (C) y marcador de peso molecular (MM; kDa).

### 4.4 Purificación e identificación de Hsp105α

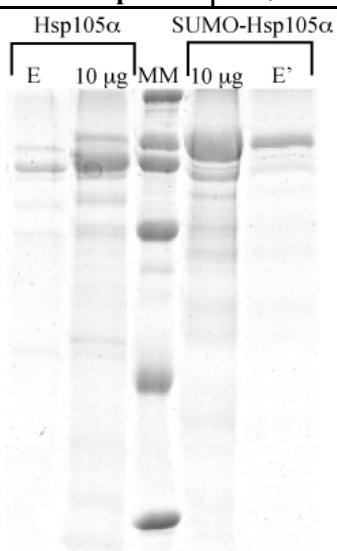
La proteína digerida fue purificada de la forma indicada en el apartado 3.2.4. La elución con tampón A<sub>1</sub> permitió purificar la proteína diana, la cual al carecer de la etiqueta de histidinas no interacciona con la resina y se obtiene en el lavado de la columna. Por otro lado, la proteína sin cortar, Ulp1 y SUMO sí interaccionaron con la resina, ya que todas tienen etiquetas de histidina, y fueron posteriormente eluidas. El análisis de la fracción con la proteína de interés mostró un mayor nivel de pureza, a pesar de ello se continuó detectando presencia de la proteína recombinante. La proteína fue dializada en tampón C y concentrada hasta el punto en el que comenzó a mostrar tendencia a agregar, lo que puede presentar problemas en los experimentos de

actividad de la proteína obtenida. Como SUMO es una proteína estabilizadora, se decidió comprobar la actividad de la proteína recombinante. Por lo tanto, se procedió a dializar la suma de volúmenes de las muestras 3 y 4 sin proteolizar, por lo que la proteína así obtenida se denominó como SUMO-Hsp105 $\alpha$ . De esta forma se comprobaría si la proteína de fusión sería capaz de llevar a cabo su actividad funcional.

Se eliminaron los posibles agregados por centrifugación, especialmente evidentes en la disolución de la proteína cortada, esto supuso una pérdida considerable de la misma. La proteínas purificadas como se ha descrito se muestran en la **Figura 7** y un análisis de la pureza se da en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Cantidad de proteína y datos de pureza estimada para Hsp105 $\alpha$  y SUMO-Hsp105 $\alpha$ .** Las muestras finales de proteína Hsp105 $\alpha$  y SUMO-Hsp105 $\alpha$  (**Fig. 7**) se analizaron por densitometría para determinar el grado de pureza.

Proteína	Masa (mg)	Concentración ( $\mu$ M)	Concentración (mg/ml)	Pureza (%)	Cortada/No Cortada x100
Hsp105 $\alpha$	3,2	33	3,2	54	85,56
SUMO-Hsp105 $\alpha$	0,65	12	1,3	46,8	0



**Figura 7. Purificación de Hsp105 $\alpha$  y SUMO-Hsp105 $\alpha$ .** Se analizó el eluido después del segundo paso por columna y diálisis en tampón C de la proteína Hsp105 $\alpha$  (E) y de SUMO-Hsp105 $\alpha$  (E'). Tras concentrar las proteínas se obtuvieron las siguientes muestras a 10  $\mu$ g. Marcadores de peso molecular (MM; kDa).

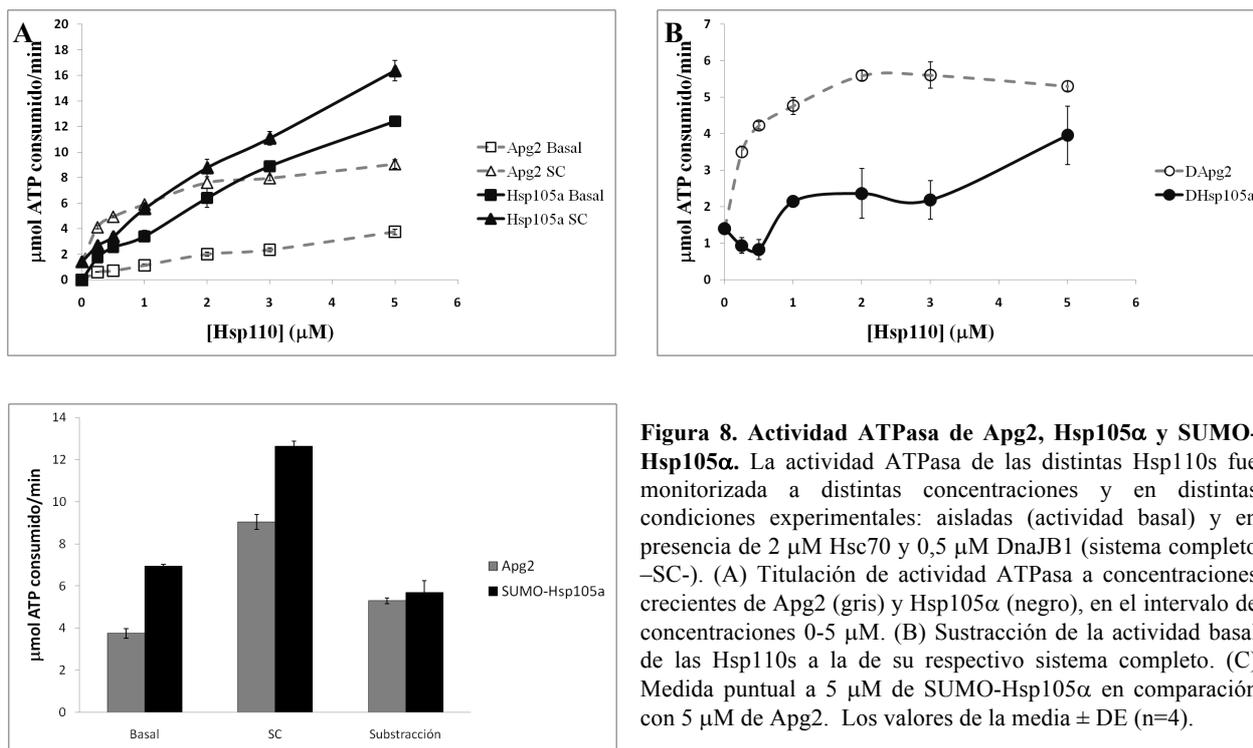
#### 4.5 Medidas de actividad ATPasa

Con el objetivo de comprobar la capacidad de Hsp105 $\alpha$  para actuar como intercambiador de nucleótido de Hsc70, se procedió a estudiar su efecto sobre la actividad ATPasa de Hsc70.

Se midió la actividad ATPasa basal de Hsp105 $\alpha$  y SUMO-Hsp105 $\alpha$  y se compararon con la de Apg2, otro representante de la familia Hsp110 bien caracterizado en nuestro grupo. Ambas proteínas obtenidas en este trabajo mostraron una ATPasa superior a la de Apg2, 3,5 y 1,8 veces mayor para Hsp105 $\alpha$  y SUMO-Hsp105 $\alpha$ , respectivamente (**Fig. 8**). Se estudió también la estimulación de la actividad del sistema de chaperonas completo, incluyendo Hsc70 y DnaJB1, además de las dos Hsp105 $\alpha$  generadas en este trabajo. El ensayo se realizó titulando las proteínas Hsp110s en el intervalo de concentraciones indicado, aunque debido a la limitación de la muestra, la titulación de SUMO-Hsp105 $\alpha$  no pudo completarse.

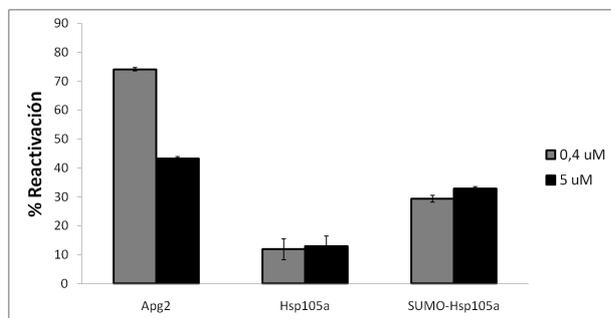
La hidrólisis de ATP por Hsc70 es de 0,64  $\mu$ mol ATP/min y se ve estimulada a 1,43  $\mu$ mol ATP/min por DnaJB1. La adición de Hsp110 incrementó las actividades de Hsc70/DnaJB1 de un modo dependiente de concentración de Hsp110, debido a la actividad intercambiadora de nucleótido. La sustracción de la actividad basal de cada Hsp110 del sistema permite observar un incremento real en la actividad ATPasa. Sin embargo,

las preparaciones de Hsp105 $\alpha$  no estimularon el sistema tanto como Apg2. Solo SUMO-Hsp105 $\alpha$  a 5  $\mu$ M mostró una activación comparable a Apg2.



#### 4.6 Capacidad de reactivación de agregados

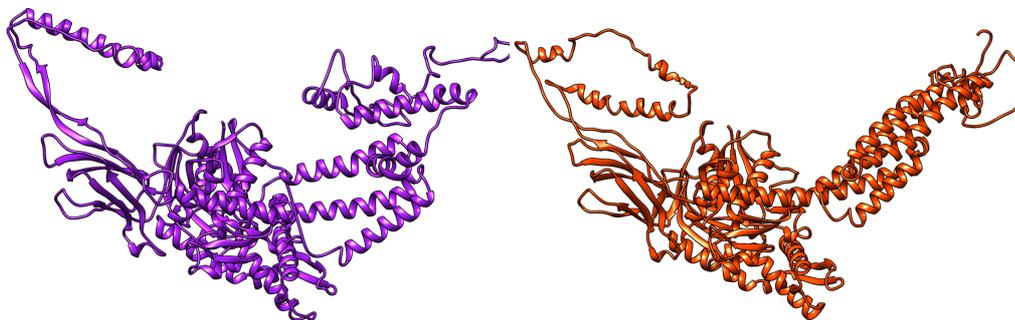
Se midió la capacidad de reactivación de agregados de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) por parte del sistema completo de chaperonas Hsc70/Hdj1/Hsp110 (**Fig. 9**). En el caso de Apg2 a 0,4  $\mu$ M se obtuvo una reactivación del 79% del sustrato. Sin embargo se encontró una inhibición parcial a 5  $\mu$ M, de acuerdo a otros autores<sup>4</sup>. En el caso de Hsp105 $\alpha$  se observó una gran fase de retardo de hasta 60 min (no mostrado), alcanzándose un repliegamiento del 23% a 0,4  $\mu$ M y 19% a 5  $\mu$ M, valores muy inferiores a los observado para Apg2. De nuevo, el empleo de SUMO-Hsp105 $\alpha$  permite observar una mejor actividad de estas fracciones, alcanzando el 46% de reactivación a 0,4  $\mu$ M. Para 5  $\mu$ M de SUMO-Hsp105 $\alpha$  no se alcanza una fase de estabilización como para Apg2.



#### Apg2 y Hsp105 $\alpha$ .

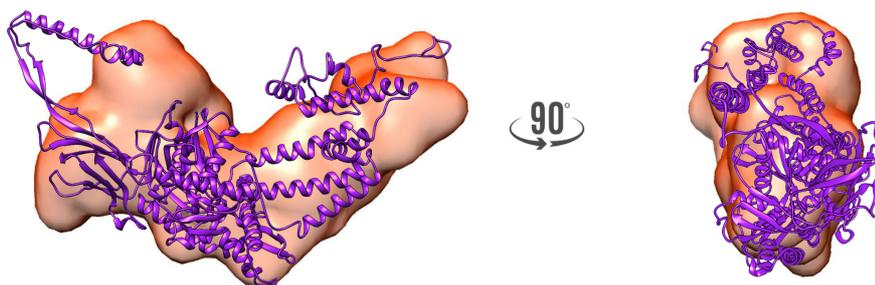
Como ejercicio complementario al trabajo realizado se procedió a un modelado por homología de las estructuras de Apg2 y Hsp105 $\alpha$ . Como se detalla en el apartado 3.4.1, se utilizaron una serie de modelos con estructura tridimensional conocida como moldes. Los modelos empleados se detallan en el **Anexo B (Tabla**

**S1).** A pesar de ello, se seguían dando regiones sin coincidencias, por lo que se emplearon las herramientas MODELLER e I-TASSER y se realizó un refinamiento por minimización de energía, como se detalla en el apartado 3.4.2. Las estructuras obtenidas se muestran en la **Figura 10** y los datos de fiabilidad de las mismas pueden encontrarse en el **Anexo C (Tabla S2)**.



**Figura 10. Modelos por homología de Apg2 y Hsp105α.** Mediante modelado por homología se obtuvieron las estructuras de Apg2 (morado) y Hsp105α (naranja).

Como método adicional para considerar la fiabilidad de las estructuras obtenidas, se realizó una superposición de la predicción con el volumen obtenido por dispersión de rayos-X de ángulo pequeño (*Small-Angle X-ray Scattering*, SAXS), resultados obtenidos por el grupo de investigación en colaboración con los Drs. Marcelo Guerin y David Albesa del CiCBiogune (**Fig. 11**). A pesar de ello, para determinadas regiones se ha empleado el solapamiento de predicciones con distintos moldes o estas carecen de uno, por lo que existe cierto margen de error.



**Figura 11. Superposición de la predicción de Apg2 por I-TASSER y resultado obtenido por SAXS.** La predicción de la estructura de Apg2 calculada mediante la herramienta I-TASSER ha sido ajustada y superpuesta sobre el resultado de SAXS.

#### 4.8 Predicción de la

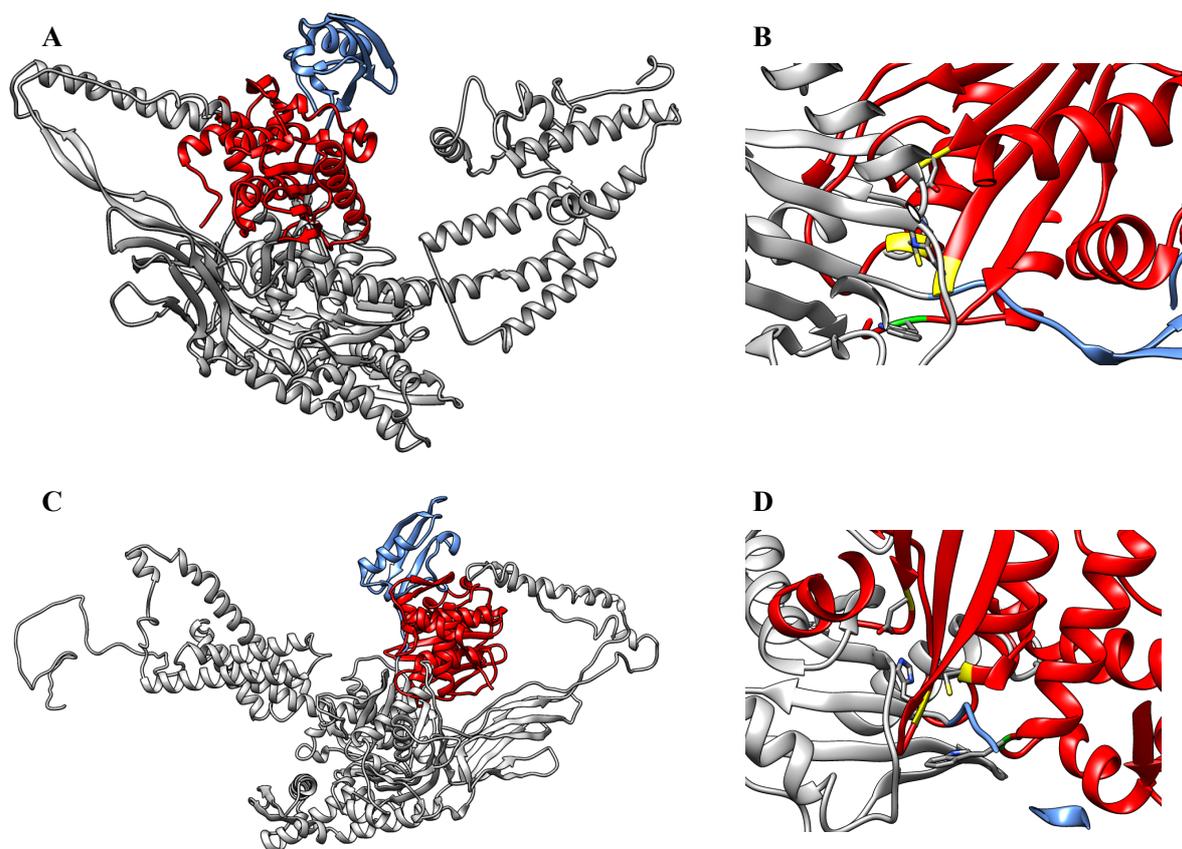
#### proteína de fusión y corte con Ulp1

Una vez obtenidas las predicciones de las proteínas estudiadas y en vista de los problemas encontrados para llevar a cabo la proteólisis y la baja actividad analizada, se decidió comprobar si la conformación de la proteína podía explicar la existencia de dos poblaciones, una accesible para Ulp1 y otra que no lo es. Anteriormente en el laboratorio se encontraron problemas similares con Apg2, cuya secuencia original mostraba 0% de corte, por lo que se empleó como control negativo de corte.

Se diseñó un modelo de la proteína recombinante en el que se unió cada estructura anteriormente mencionada con la secuencia de SUMO (Smt3) extraída de la estructura cristalizada en complejo con Ulp1 con PDBID: 1EUU. Tras un nuevo refinamiento que permitiera la disposición óptima de SUMO se estimó la fiabilidad de los modelos para confirmar que se trabajaba con modelos realistas.

A continuación, se procedió al posicionamiento de Ulp1 en base al complejo cristalizado<sup>22</sup>. Esto requirió de la disposición correcta de las regiones de reconocimiento e interacción entre SUMO y Ulp1, así como la disposición espacial adecuada de la triada de aminoácidos del centro catalítico para la escisión de la secuencia de reconocimiento Gly-Gly-X (**Fig. S1**). Finalmente se obtuvo la predicción tridimensional de las dos

estructuras que corresponderían al evento de proteólisis que daría lugar a la obtención de la proteína en su secuencia original y la eliminación de SUMO y la etiqueta de histidinas (**Fig. 12**).



**Figura 12. Interacción de Ulp1 con las proteínas de fusión con SUMO-Smt3 y Apg2 o Hsp105 $\alpha$ .** Reconocimiento de SUMO-Smt3 (cian) por parte de Ulp1 (rojo) e interacción del centro catalítico con la secuencia de escisión en las proteínas de fusión de Apg2 (A-B) y Hsp105 $\alpha$  (C-D). La triada catalítica de Ulp1 formada por la His514, Arg531 y Cys580 (amarillo) y el Trp448 (verde), que actúa como ayudante para la disposición de las distancias de reacción, se sitúan en el enlace peptídico entre el último y primer residuo de SUMO y la proteína diana respectivamente.

En las predicciones con las Hsp110s, el extremo N-terminal se dispone embebido en el núcleo de la proteína y flanqueado por estructuras secundarias estables de hojas- $\beta$ . La disposición de la secuencia de corte de Ulp1 se encontraría en un espacio que dificultaría la interacción de la Cys530 de Ulp1 con la Gly98 de Smt3 necesaria para la hidrólisis. Debido a que los modelos empleados para el diseño de las predicciones poseían alta homología en el N-terminal, puede considerarse como una aproximación más cercana a la realidad, lo que permite una mayor valoración de los datos obtenidos.

*Los archivos .pdb de las predicciones empleadas en este trabajo pueden encontrarse en el siguiente enlace:*  
[https://www.dropbox.com/sh/t3ykndfhi8j0wq4/AAAflIEVn3cBQoIj\\_OhXy\\_La?dl=0](https://www.dropbox.com/sh/t3ykndfhi8j0wq4/AAAflIEVn3cBQoIj_OhXy_La?dl=0).

## 5 DISCUSIÓN

La trascendencia de la actividad desagregasa en el aspecto clínico hace del estudio de las chaperonas moleculares una herramienta importante para comprender las enfermedades en las que se da la predisposición de la agregación proteica o el envejecimiento<sup>2</sup>. Por lo tanto, detallar la actividad de los componentes del sistema desagregasa es de gran importancia. Es el caso de las Hsp110s humanas, cuya relevancia como NEF

y protector de agregación es evidente, aún se debe esclarecer si son capaces de llevar a cabo funciones más allá de su colaboración con Hsp70<sup>4,6</sup>.

Con dicho fin, se dispuso a expresar la Hsp105 $\alpha$ . A pesar de un clonaje y expresión de la proteína exitoso, la purificación realizada en este trabajo presentó diversos obstáculos. En primer lugar, la pérdida constante de proteína en cada elución denota una interacción deficitaria con la resina de Ni<sup>+</sup>-NTA. Se descarta una posible saturación de la columna, ya que en el paso por la segunda columna seguía produciéndose filtración de proteína recombinante no proteolizada y nada de ULP1, apuntando a la naturaleza de la proteína. Por lo tanto, a pesar de la homología de secuencia entre Apg2 y Hsp105 $\alpha$ , se debe reconsiderar el proceso de purificación con dos posibles medidas:

1. Se propone disminuir la concentración de imidazol en los tampones A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> a 5 mM, mejorando la retención en el paso por la primera columna. Como medida suplementaria convendría reducir el flujo de la muestra en el paso por columna, propiciando la interacción con la resina, a lo que se le podría sumar un fraccionamiento de la carga de sobrenadante en más pasos
2. El segundo punto de mejora radicaría en el empleo de un gradiente continuo de concentración de imidazol para la recolección de las fracciones, lo cual podría mejorar su pureza final..

Convendría considerar si una vez mejorada la purificación se puede estar dando una pérdida sustancial por interacción con las membranas de diálisis.

El punto más llamativo radica en la eficiencia del 51% de corte por parte de la proteasa, independientemente de la concentración y el tiempo de incubación con la misma, lo cual denota la presencia de dos poblaciones independientes de la proteína. El empleo de SUMO presenta dos ventajas importantes. En primer lugar la eficiencia de corte por parte de Ulp1 es elevada en comparación a otras proteasas. En segundo lugar, la proteólisis en el residuo Gly98 de SUMO<sup>22</sup> da una proteína sin modificaciones en su secuencia. A esto se le añade el hecho de que la presencia de SUMO mejora la solubilidad de las proteínas recombinantes en la sobreexpresión. Por lo tanto, en vista de preservar la estrategia de purificación mediante el uso de SUMO y buscar comprender la presencia de las dos poblaciones, se estudió la conformación que podía adoptar la proteína recombinante mediante predicciones computacionales.

En el caso de las dos Hsp110s, el N-terminal comienza enclaustrado entre un núcleo compacto de la proteína, por lo que la secuencia de corte apenas se encuentra interaccionando con el disolvente. Al añadir la estructura de Ulp1 en la disposición que adoptaría para la proteólisis, se da un impedimento estérico de las estructuras de ambas proteínas, lo que hace imposible el corte del enlace peptídico entre la Gly de SUMO y la Ser de las Hsp110s. La posible acomodación de ambas estructuras para facilitar la catálisis quedaría descartada debido a la compactación de hojas- $\beta$  presentes en esta región del NBD, hecho comprobado experimentalmente mediante ensayos de proteólisis<sup>23</sup>. De esta forma se justificarían los problemas encontrados tanto para la escisión de la proteína recombinante de Hsp105 $\alpha$ , como la ausencia completa de corte observada con anterioridad para Apg2. Se estima que para asegurar el corte por parte de Ulp1 se requiere una distancia de al menos 5 Å<sup>22</sup>, por lo que se requeriría de añadir un espaciador entre la secuencia de corte y el inicio de la proteína. A pesar de estar procediendo a la modificación de la secuencia original, este es un aspecto que se

seguiría alterando en caso de optar por otra proteasa, ya que estas tienden a dejar residuos de la secuencia de corte en la proteína. La efectividad de esta solución ha sido ya testada para Apg2, siendo exitosa mediante la adición de cuatro residuos (GAGA), por lo que confirma las predicciones empleadas por ordenador y valida los modelos. Respecto a la población que sí sufre proteólisis se abordará más adelante.

A nivel experimental, la baja pureza de las muestras no permite observar la actividad real de Hsp105 $\alpha$ . Tanto la actividad ATPasa como la de reactivación son inferiores a las obtenidas para Apg2 a pesar de que estas deberían ser semejantes<sup>4,24</sup>. Por un lado, la elevada actividad ATPasa basal de la fracción proteolizada denota una posible contaminación de ATPasas celulares con una actividad catalítica muy superior. Por otro lado, las actividades elevadas de Hsp105 $\alpha$  que se observan dificultan la medida con el método empleado, pudiendo enmascarar los efectos estimulatorios de la proteína en el sistema de chaperonas completo y dificultar el ciclo de reactivación de agregados al no poderse suplir el consumo de ATP por el sistema regenerador. Además, debido a la escasa pureza (en torno al 50%), la concentración de Hsp105 $\alpha$  real que se añade al experimento resultará considerablemente inferior a aquella que se desea añadir, lo que impide alcanzar la actividad esperada. No obstante, debe mencionarse que se pudo observar capacidad de reactivación de agregados para Hsp105 $\alpha$  y especialmente para SUMO-Hsp105 $\alpha$ , lo que indica que se puede obtener proteína activa siguiendo el método empleado con las optimizaciones oportunas.

El descenso de actividad ATPasa observado para 5  $\mu$ M Apg2 viene corroborado por los ensayos experimentales previos, mostrando una inhibición del ciclo de Hsc70 a partir de una relación Apg2:Hsc70 de 2:1. Cabe destacar que la concentración óptima de Apg2 en los ensayos de reactivación de agregados es de 0,4  $\mu$ M, a partir de donde comienza a decaer. Los motivos aún deben ser verificados, pero apuntarían a la dificultad de Hsc70 de interactuar correctamente con los agregados, explicable por un ciclo excesivamente acelerado por la alta concentración de NEF que reduciría el tiempo y la interacción de la Hsc70 con el agregado para su replegamiento.

La actividad de la proteína sometida a proteólisis es muy limitada, más considerando que a pesar de la presencia de SUMO esta muestra actividad, como se observa para el empleo de las fracciones de SUMO-Hsp105 $\alpha$ . Puede deberse a una actividad deficitaria por parte de la fracción proteolizada. Este factor se comprende mejor al considerar los resultados obtenidos en las predicciones computacionales. En base a ellos y considerando la compactación del N-terminal de Hsp105 $\alpha$ , el corte por Ulp1 solo podría darse por una exposición de esta región al disolvente explicable por una conformación mal plegada de la proteína, lo que justificaría interacciones no productivas.

## 6 CONCLUSIÓN

1.- Hsp105 $\alpha$  humana puede obtenerse de modo recombinante empleando el vector pE-SUMO en células de *E.coli*. El protocolo de purificación aquí empleado debe ser optimizado.

2.- La proteína obtenida es activa en cuanto a reactivación de agregados proteicos aunque con niveles inferiores a lo esperado. Esto puede deberse fundamentalmente a la baja pureza de las muestras obtenidas.

3.- Los modelos estructurales de Hsp105 y Apg2 son compatibles con la baja eficacia del corte de las proteínas recombinantes por Ulp1, lo que permitiría su uso como herramienta complementaria en el diseño de proteínas de fusión.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Mogk, A., Bukau, B. & Kampinga, H. H. Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. *Mol. Cell* **69**, 214–226 (2018).
2. Morimoto, R. I. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev.* **22**, 1427–1438 (2008).
3. Hartl, F. U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324–332 (2011).
4. Rampelt, H. *et al.* Metazoan Hsp70 machines use Hsp110 to power protein disaggregation. *EMBO J.* **31**, 4221–4235 (2012).
5. Mayer, M. P. & Bukau, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 670–684 (2005).
6. Aguado, A., Fernández-Higuero, J. A., Moro, F. & Muga, A. Chaperone-assisted protein aggregate reactivation: Different solutions for the same problem. *Arch. Biochem. Biophys.* **580**, 121–134 (2015).
7. Liu, T., Daniels, C. K. & Cao, S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* **136**, 354–374 (2012).
8. Nillegoda, N. B. & Bukau, B. Metazoan Hsp70-based protein disaggregases: emergence and mechanisms. *Front. Mol. Biosci.* **2**, 1–12 (2015).
9. Saito, Y., Yamagishi, N. & Hatayama, T. Different localization of Hsp105 family proteins in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* **313**, 3707–3717 (2007).
10. Zappasodi, R. *et al.* HSPH1 inhibition downregulates Bcl-6 and c-Myc and hampers the growth of human aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **125**, 1768–1771 (2015).
11. Coulouris, Y., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **18**, 13:134 (2012).
12. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
13. Buchan, D. W. A., Minneci, F., Nugent, T. C. O., Bryson, K. & Jones, D. T. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res.* **41**, 349–357 (2013).
14. Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 1–8 (2018). doi:10.1093/nar/gky427
15. Goujon, M. *et al.* A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **38**, 695–699 (2010).
16. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
17. Eswar, N. *et al.* Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current protocols in bioinformatics* **Chapter 5**, (2006).
18. Yang, J. & Zhang, Y. Protein structure and function prediction using I-TASSER. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **52**, 1–24 (2016).
19. Xu, D. & Zhang, Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys. J.* **101**, 2525–2534 (2011).
20. Colovos, C. & Yeates, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* **2**, 1511–1519 (1993).
21. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
22. Mossessova, E. & Lima, C. D. Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol. Cell* **5**, 865–876 (2000).
23. Mattoo, R. U. H., Sharma, S. K., Priya, S., Finka, A. & Goloubinoff, P. 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 (2013).

# ANEXO A

## Tampón TAE

40mM Tris, 20mM ácido acético y 1mM EDTA.

## Tampones de purificación

- **Tampón de lisis:** 20 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 350 mM NaCl, 10 mM imidazol pH 8. 20% (p/v) sacarosa, 5% (v/v) glicerol, 0,2% (v/v) Tritón X-100, 1 mM PMSF, inhibidor de proteasa libre de EDTA (Roche).
- **Tampón de unión (A<sub>1</sub>):** 20 mM Tris-HCl pH8, 10 mM mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 350 mM NaCl, 10 mM imidazol pH8, 5% (v/v) glicerol.
- **Tampón de lavado (A<sub>2</sub>):** 20 mM Tris-HCl pH8, 10 mM mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1 M NaCl, 10 mM imidazol pH 8, 5% (v/v) glicerol.
- **Tampón elución (B):** 20 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 350 mM NaCl, 400 mM imidazol pH 8, 5% (v/v) glicerol.
- **Tampón de diálisis (C):** 25 mM HEPES pH 7,6, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM KCl, 5% (v/v) glicerol.

## Tampones actividad ATPasa y Reactivación de agregados

- **Tampón de reacción:** 40 mM Hepes pH 7,6, 50 mM KCl, 5 mM MgAcet, 2 mM DTT.
- **Tampón de actividad:** 50 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM KCl, 10 mM DTT, 2,5 mM G6P, 1 mM NADP<sup>+</sup>.
- **Tampón de agregación:** 50 mM Tris-HCl pH=7,5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM KCl, 10 mM DTT.
- **Tampón de ensayo:** 40 mM Hepes pH=7,6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl, 2 mM DTT.



```

Apg2          EDDRNSFTLKLLEDTENWLYEDGEDQPKQVYVDKLAELKNLGQPIKIRFQESEERPFLFEE 701
              :  ::  .:  *  .:*:*:*:*:* *  .  *  *:  *  **  .:*  ::  *:  **  .  *  .

Sse1 (3c7n)   SKQEASQMAAMAEDIAEKLAARQAEEAEKKEEKDTEGDVDM----- 693
Hsp105a      LGQRLQHYAKIAADF-----RNKDEKYNHIDESEMKKVEKSVNEVMEWMNVMNAQA 770
Apg2         LGKQIQQYMKI IISF-----KNKEDQYDHLDAADMTKVEKSTNEAMEWMNKLNLQN 753
              :.  .:  :  .:  .:*:*:*  :  .  :  *

Sse1 (3c7n)   ----- 693
Hsp105a      KKSLDQDPVVRAQEIKTIKIKELNNTCEPVVTPQPKPKIESPKLERTPNGPNIDKKEEDLED 830
Apg2         KQSLTMDPVVKSKEIEAKIKELTSTCSP IISKPKPKVEPPKKEEQKNAEQNGPVDG----Q 809

Sse1 (3c7n)   ----- 693
Hsp105a      KNNFGAEPHQN-GECYPN--EKNSVNMDLD 858
Apg2         GDNPGPQAAEQGTD TAVPSDSKKLPEMDID 840

```

### Alineamiento C-terminal con el molde U-box de CHIP

```

Chip_U-box (2c21)   SPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYGRAITRNPLVAVYYTNRALCYLKMQQPEQALAD 60
Hsp105a (aa:724-858) -----QHYAKIAA-----DFRNKDEKYNHIDESEMK--- 26
Apg2 (aa:707-840)  -----QQYMKI IIS-----SFKNKEDQYDHLDAADMT--- 26
                  :*:  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

Chip_U-box (2c21)   CRRALELDGQSVKAHFFLGQCQLEMESYDEAIAIANLQRAYSLAKEQRLNFGDDIPALRIA
120
Hsp105a (aa:724-858) -----K-----VEKSVNEVMEWMNVMNAQAKKSLDQD-----PVVRAQEIKT 64
Apg2 (aa:707-840)  -----K-----VEKSTNEAMEWMNKLNLQNKQSLTMD-----PVVKSKEIEA 64
                  :  :  :  :  :  *  .:  :  *  *  **  :  :  :  :

Chip_U-box (2c21)   KKKRWNSIEERRIHQES-ELHSY-LTRLI----AAERERELEECQRNHGHEDDGHI---
171
Hsp105a (aa:724-858) KIKELNNTCEPVVTPQPKPKIESPKLERTPNGPNIDKKEEDLED--KNNFGA-EPPHQNG-
120
Apg2 (aa:707-840)  KIKELTSTCSP IISKPKPKVEPPKKEEQKNAEQNGPV-----DGQGD-NPGPQAAE
113
                  *  *.  .  .  :  :  .  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

Chip_U-box (2c21)   RAQQACIEAKHKYMADELFSDVDEKRRKRDPDYLCGKISFELMREPCITPSGITYD
231
Hsp105a (aa:724-858) -----ECYPN--EKNSVNMDLD-----
135
Apg2 (aa:707-840)  QGTD TAVPSDSKKLPEMDID-----
134
                  .  :  *  :  **

Chip_U-box (2c21)   RKDIEEHLQRVGHFNPVTRSPLTQEQLIPNLAMKEVIDAFISENGWVEDY 281
Hsp105a (aa:724-858) ----- 135
Apg2 (aa:707-840)  ----- 134

```

<b>Tabla S1. Información de los modelos empelados para generar las predicciones por homología.</b> Tanto para Hsp105α como Apg2 se emplearon dos moldes para producir la estructura terciaria.			
<b>Diana</b>	<b>Modelo</b>	<b>Organismo</b>	<b>Identidad</b>
<b>Hsp105α</b>	Sse1 (3c7n)	<i>S. cerevisiae</i>	37%
<b>Hsp105α C-terminal (724-858)</b>	CHIP U-box E3 (2c21)	<i>H. sapiens</i>	41%
<b>Apg2</b>	Sse1 (3c7n)	<i>S. cerevisiae</i>	66%
<b>Apg2 C-terminal (707-840)</b>	CHIP U-box E3 (2c21)	<i>H. sapiens</i>	36%

# ANEXO C

**Tabla S2. Valores ERRAT de los modelos predichos antes y después de las minimizaciones de energía en ModRefiner. La herramienta ERRAT emplea una medición de factor de calidad en base a las interacciones atómicas.**

<b>Modelo</b>	<b>Evaluación inicial con ERRAT</b>	<b>Evaluación con ERRAT tras minimización de energía</b>
<b>Hsp105<math>\alpha</math></b>	76,5882	83,0189
<b>SUMO-Hsp105<math>\alpha</math></b>	88,121	99,061
<b>Apg2</b>	78,125	93,1579
<b>SUMO-Apg2</b>	88,0133	98,5294