

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**Mecanismo de degradación de proteínas con topologías anudadas mediado por la proteasa dependiente de ATP ClpXP de *Escherichia coli*: una aproximación *in multiplo* e *in singulo*.**

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

**ÁLVARO SAN MARTÍN VARELA**

**Director de Tesis: Dr. Mauricio Baez Larach**

**Santiago-CHILE**

**Noviembre 2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS**

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

**ÁLVARO SAN MARTÍN VARELA**

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

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Mauricio Baez Larach**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Christian A.M. Wilson**

---

**Dr. María Antonieta Valenzuela**

---

**Dr. Nelson Barrera**

---

**Lugar de desarrollo de la tesis:**

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

Laboratorio de Biofísica del Dr. Carlos Bustamante Universidad de California  
Berkeley, Estados Unidos.

**Financiamiento:**

**Proyecto Fondecyt Chile, código: 1151274:** Folding and degradation of  
proteins with knotted topologies: implications for folding of proteins and  
unfolding and translocation mechanism of ATP-dependent proteases (ClpXP).  
**2015-2019.** IP. Mauricio Báez Larach.

**Beca CONICYT** magister Nacional 2015, **Folio:** 22151447

*“La función de un investigador científico no es sólo el hacerse preguntas y resolverlas con el método científico, sino que también consiste en encuadrar los datos experimentales y las teorías en un diseño armonioso que refleje la belleza y ritmo de la naturaleza. En esta última función, no hay nada que diferencie al hombre de ciencias del artista.”*

-Jorge E. Allende

## Agradecimientos

Esta tesis, sin dudas, ha sido una de las cosas más difíciles que he tenido que realizar en mi vida. Afrontar los constantes fracasos sin caer en la frustración no es cosa fácil, y debo agradecer a todos aquellos que hicieron más feliz esta etapa de mi vida y que me ayudaron a crecer en este proceso.

Agradezco a Mauricio, mi director de tesis, por recibirme en su laboratorio y confiarme este ambicioso proyecto. Gracias por hacer posible mi estadía en Berkeley, por inculcarme la rigurosidad en el trabajo de laboratorio y por ayudarme a mejorar mi escritura científica.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Alejo, Andriu, Andreas, Maira y Moreno por ser parte esencial en mi desarrollo como científico. Gracias por todos los asquerosos y peruvians que comimos juntos. Especiales agradecimientos al Alejo por trabajar en paralelo conmigo, sin tu ayuda hubiese sido muy difícil sacar este proyecto adelante, pero por sobre todo gracias por inmortalizar el Chocapic.

Agradezco al laboratorio del Dr. Carlos Bustamante por darme la oportunidad de trabajar con ellos. Gracias a Piere Rodriguez, a Olga Manouvakhova y a Cesar Diaz por toda la ayuda laboral y la amistad que me brindaron durante mi estadía. Muchas gracias al profe Carlos por hacerme sentir bienvenido en su laboratorio y por la increíble y afectuosa manera en que me trató a mí, a mi mamá y a Luis. Su excelencia como científico y su integridad como persona son y serán para mí un ejemplo a seguir.

Gracias a la directora del Magister Daniela Seelenfreund y al director de carrera Dante Miranda por siempre brindarme ayuda en los momentos en que la necesité.

Quiero agradecer a todos mis amigos, especialmente a los Logis Chupaperros por todo lo compartido en estos 7 años de carrera. Gracias Árabe por ser mi camarada a lo largo de todo el pregrado, por los infinitos trabajos que hicimos juntos por todas las exposiciones en que la rompimos, pero sobre todo por tu fraternal amistad, por apañarnos a todas. Gracias a Martuca por todas las ideas discutidas, por ayudarme a ver con claridad en los momentos difíciles y por todo lo que he aprendido de ti crack!

Gracias a mi polola Tatiana que, como GFP, fue la compañera que me apañó a lo largo de toda esta complicada tesis, dándole luz y color a esos días grises en el laboratorio. Gracias totales por darme los ánimos para afrontar la pequeña gran odisea que fue Berkeley, fuiste la clave para el éxito.

Finalmente agradecer a los más importantes, a mi familia. Si a alguien le debo todos los logros alcanzados en esta carrera es a mi hermosa familia. Gracias a mis tíos, mis tías y a mis primos por su apoyo e infinito cariño. Gracias a la matriarca Yoly por constante preocupación, por el apoyo incondicional y por enseñarnos a catar vino al estilo *le bigottier*. Gracias a mis hermanos Pablo y Jose por ser unos ejemplazos a seguir, por poder aprender de ustedes, tanto de sus tropiezos como de sus incontables éxitos. Gracias a mis hermanitos Tommy y Diego por ser mis chanflines preferidos que me alegran el día cada vez que los veo, y a la Jani por darme estos

increíbles hermanos. Gracias a mi papá por sus consejos certeros y por ser un ejemplo de cómo una persona se puede reinventar luego de los tiempos difíciles. Gracias al Lucho por ser una buena oreja y tratarnos a los tres como si fuéramos sus hijos. Por sobre todas las cosas, gracias a mi madre por ser el pilar fundamental de la familia, por todo lo que has sacrificado por mí, por educarme y por darme los valores y principios que me han permitido cumplir mis metas y llegar hasta aquí de esta manera.

# ÍNDICE

<b>Índice</b> .....	i
<b>Índice de figuras</b> .....	iii
<b>Índice de tablas</b> .....	iv
<b>Abreviaturas</b> .....	v
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	3
<b>1. Introducción</b> .....	5
<b>1.1. Propiedades estructurales y funcionales de proteínas anudadas</b> .....	5
<b>1.2. Proteínas anudadas como sustratos de proteasas dependiente de ATP</b> .....	9
<b>2. Hipótesis</b> .....	16
<b>3. Objetivos</b> .....	16
<b>3.1. Objetivo general</b> .....	16
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	16
<b>4. Materiales y metodología</b> .....	17
<b>4.1. Reactivos e insumos</b> .....	17
<b>4.2. Metodología</b> .....	18
<b>5. Resultados</b> .....	24
<b>5.1. Objetivo específico 1</b> .....	24
<b>5.2. Objetivo específico 2</b> .....	35

<b>6. Discusión</b> .....	39
<b>6.1.</b> Mecanismo de protección de GFP por el nudo .....	39
<b>6.2.</b> Tensión en los ensayos de degradación realizados en pinzas ópticas .....	42
<b>6.3.</b> Interpretación de las cinéticas de degradación de los sustratos multidominio con espaciadores de titina .....	44
<b>6.4.</b> Relación entre la interferencia de los nudos en procesos de degradación y su baja representación en la naturaleza .....	46
<b>7. Proyecciones</b> .....	47
<b>8. Conclusiones</b> .....	48
<b>9. Bibliografía</b> .....	49
<b>10. Material suplementario</b> .....	53



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Topologías anudadas presentes en proteínas .....	6
<b>Figura 2.</b> Topologías anudadas y resistencia al desplegamiento.....	7
<b>Figura 3.</b> Topologías anudadas en proteínas pueden obstruir poros .....	8
<b>Figura 4.</b> Estructura y función de la proteasa ATP dependiente ClpXP .....	10
<b>Figura 5.</b> Estructura de proteínas anudadas propuestas como sustratos de ClpXP .....	12
<b>Figura 6.</b> Ensayos de degradación a nivel de molécula individual.....	14
<b>Figura 7.</b> Subclonamiento sustratos anudados multidominio para ClpXP .....	23
<b>Figura 8.</b> Estabilidad y estado oligomérico de los sustratos anudados.....	25
<b>Figura 9.</b> Cinéticas de degradación de MJ0366-ssrA, GFP-ssrA y GFP-MJ0366-ssrA .....	26
<b>Figura 10.</b> GFP-MJ0366-ssrA es reconocido y degradado parcialmente por ClpXP.....	28
<b>Figura 11.</b> Tamaño del producto de degradación parcial de GFP-MJ0366-ssrA.....	30
<b>Figura 12.</b> La protección de GFP es dependiente de su distancia con MJ0366 .....	32
<b>Figura 13.</b> Modelo para degradación de sustratos anudados multidominio por ClpXP .....	34
<b>Figura 14.</b> Diseño y ensamblado del sistema de degradación en pinzas ópticas.....	36
<b>Figura 15.</b> Trayectorias de degradación del sustrato multidominio para pinzas ópticas.....	38

### **Material Suplementario:**

<b>Figura S1.</b> Sustratos anudados que no se continuaron estudiando .....	53
<b>Figura S2.</b> MJ0366-ssrA es degradado sin generar productos de degradación parcial .....	54
<b>Figura S3.</b> Esquema experimentos de intercambio de subunidades .....	54
<b>Figura S4.</b> Caracterización de banda fluorescente secundaria .....	55
<b>Figura S5.</b> Cromatogramas de ensayos de degradación de sustratos multidominio.....	55
<b>Figura S6.</b> Sustratos con espaciador de titina están anudados.....	56
<b>Figura S7.</b> GFP-MJ0366-Titina-ssrA se pliega correctamente.....	57
<b>Figura S8.</b> Caracterización de hombros cromatográficos.....	57

# **ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos ..... 27

**Tabla 2.** Caracterización de sustratos anudados para ClpXP ..... 33

## **Material suplementario:**

**Tabla S1.** Peso molecular GFP-MJ0366-Titina-ssrA ..... 57

**Tabla S2.** Grado de contaminación de las preparaciones. . . . . 58

## **ABREVIATURAS.**

**°C:** Grados celsius.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ARNt:** Ácido ribonucleico de transferencia.

**C-terminal:** Carboxilo terminal

**DTT:** Ditioneitol

**GFP:** Proteína fluorescente verde

**kb:** Kilo bases

**kDa:** Kilo daltons

**AAA+:** ATPasas Asociadas a diversas Actividades

**dNTP:** Desoxirribonucleótidos.

**EDTA:** Ácido etildiaminotetraacético.

**nm:** Nanómetros

**N-terminal:** Amino terminal

**MALDI-TOF:** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionización (desorción/ionización láser asistida por matriz) - Time-Of-Flight (tiempo de vuelo).

**min:** Minutos

**mM:** Milimolar

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**pN:** Piconewtons

**s:** Segundos

**TEV:** Virus del grabado del tabacco

**μM:** Micromolar

## **RESUMEN**

Las proteínas son los polímeros más complejos sintetizados en la naturaleza, estas deben plegarse y adoptar complicadas estructuras tridimensionales para cumplir su función. Más aún, algunas proteínas requieren enhebrar su cadena principal formando un nudo para llegar a su estructura final. Entender como estos nudos (o topologías anudadas) afectan las propiedades y función de las proteínas ha sido un tema de gran interés en biofísica. Así como una cuerda obtiene una nueva función o comportamiento con un nudo, las proteínas anudadas podrían tener propiedades únicas, muy distintas a su contraparte desanudada.

Simulaciones moleculares realizadas con polímeros con similar grado de compactación de las proteínas, indican que si el plegamiento de una proteína fuera un proceso al azar la probabilidad de que estas formen un nudo puede llegar a ser de un 90%. Sin embargo sólo un 0,5% de las estructuras de proteínas conocidas poseen un nudo. En consecuencia, se ha propuesto que las proteínas con topologías anudadas han sido seleccionadas negativamente durante la evolución.

La presente tesis tiene como objetivo dilucidar si las topologías anudadas en proteínas dificultan procesos biológicos asociados a la translocación de proteínas. Los procesos de translocación de proteínas son fundamentales para la viabilidad celular, ya que permiten la correcta localización celular de proteínas así como también su degradación selectiva. Experimentos *in silico* muestran que los nudos podrían obstruir el paso de las proteínas que los contienen obstruyendo su translocación a través de canales o poros estrechos. Para poner a prueba esta hipótesis se utilizó la proteasa ATP dependiente ClpXP de *Escherichia coli* como un modelo para ensayar la translocación y degradación de proteínas anudadas tipo 3<sub>1</sub>. Esta proteasa se encarga de degradar selectivamente sustratos proteicos, desplegándolos mecánicamente para luego translocarlos a través de su estrecho poro central. Si las topologías anudadas dificultan estos procesos se podría explicar su baja representación en la naturaleza.

Se encontró que la proteína anudada MJ0366, de *Methanocaldococcus jannaschii*, se degrada fácilmente por ClpXP cuando su degradación comienza desde su extremo C-terminal. Sin embargo, cuando se agregó la proteína fluorescente verde (GFP), que normalmente es

degradada por ClpXP, al extremo libre de MJ0366 (extremo N-terminal), la proteasa es incapaz de degradar este sustrato multidominio liberando un producto parcialmente degradado. El peso molecular de este producto corresponde a GFP más 48 aminoácidos, este tamaño sugiere que el nudo de MJ0366 se aprieta contra el dominio plegado de GFP, protegiéndola de la degradación. No obstante, cuando se incrementa la distancia entre GFP y MJ0366, mediante la inserción de un polipéptido desplegado, la protección de GFP disminuye dramáticamente. Estos resultados indican la existencia de dos posibles vías para la degradación de sustratos anudados multidominio: **i)** el nudo se desliza y aprieta contra GFP deteniendo la degradación, o **ii)** el nudo es translocado por ClpXP cuando este se aprieta antes de llegar GFP. En este último caso ClpXP puede degradación de todo el sustrato.

Para estudiar en mayor detalle el mecanismo de degradación de los sustratos multidominio anudados, se realizaron ensayos de degradación *in singulo* en pinzas ópticas de alta resolución. Esta metodología permitió estudiar los eventos de desplegamiento y translocación separadamente. Resultados preliminares, muestran que el nudo no afecta la estabilidad mecánica de MJ0366, sino que afecta la eficiencia de translocación de MJ0366 y la capacidad de ClpXP para desplegar GFP. Estos resultados son la primera evidencia experimental de que las topologías anudadas pueden detener procesos asociados a la translocación y describen por primera vez, *in vitro*, la dinámica del movimiento de un nudo en una cadena polipeptídica.

## **ABSTRACT**

### **Degradation mechanism of knotted proteins by the ATP dependent protease ClpXP of *Escherichia coli*: an *in multiplo* and *in singulo* approach.**

Proteins are the most complex polymers synthesized by the nature, they have to fold and adopt intricate three-dimensional structures to fulfill its functions. Even more, some proteins need to thread its main chain and form a knot to achieve its native state. How these knots (or knotted topologies) affect the properties and functions of proteins is a subject of great interest in biophysics. In the same way that a knot can give new functions or behaviors to a rope, knotted proteins could have unique properties, very different from unknotted ones.

Molecular simulations have shown that randomly compacted protein polymers have a high probability to form knots. However, only 0.5% of the protein structures in the protein data bank present a knot in their structures, in consequence it has been proposed that knotted topologies have been negatively selected by evolution.

The aim of this thesis is to determine if knotted topologies in proteins hinder biological processes associated with protein translocation. Translocation of proteins is a fundamental process for cell viability; it allows the correct localization of proteins in the cell and the control of protein levels through degradation. Molecular dynamics have shown that knots in proteins can obstruct narrow pores during translocation, but there is no experimental evidence yet. To test this hypothesis, we used the ClpXP ATP dependent protease of *Escherichia coli* to study the translocation of knotted proteins. To degrade its protein substrates, ClpXP needs to mechanically unfold them and translocate their polypeptide chain through its narrow pore. If knotted topologies can obstruct protein degradation, it could explain why there are so few knotted proteins.

It was found that ClpXP easily degrade a knotted protein of *Methanocaldococcus jannaschii*, MJ0366, when a degradation tag is added to its C-Terminal end. However, when the green fluorescent protein (GFP), a normally degradable domain, is added to the N-Terminal end of MJ0366, ClpXP is unable to degrade this multidomain substrate releasing a partially degraded product with an intact GFP domain. The molecular weight of this partially degraded product suggests that the knot tightens against the folded domain of GFP,

protecting it from degradation. However, when the distance between MJ0366 and GFP increased, by the insertion of an unfolded polypeptide, the degree of protection of GFP decrease dramatically. This results indicates two possible outcomes for multidomain knotted substrate degradation: **i)** the knot can slide and tighten against GFP, thus stopping degradation, or **ii)** the knot is translocated through ClpXP pore when the knot tightening occurs before reaching GFP, leading to complete substrate degradation.

To study the mechanism of degradation of the knotted multidomain substrates in detail, *in singulo* degradation assays were performed in high resolution optical tweezers. This approach allowed the characterization of the impact of the knotted topologies in the unfolding and translocation steps. Preliminary results show that the knot does not affect the mechanical stability of MJ0366, but can generate pauses during translocation and even stalls ClpXP for minutes when trying to unfold GFP. These results are the first experimental evidence of knotted topologies impairing a biological process associated with translocation and describe, *in vitro*, the dynamic of knot movement on a polypeptide chain.

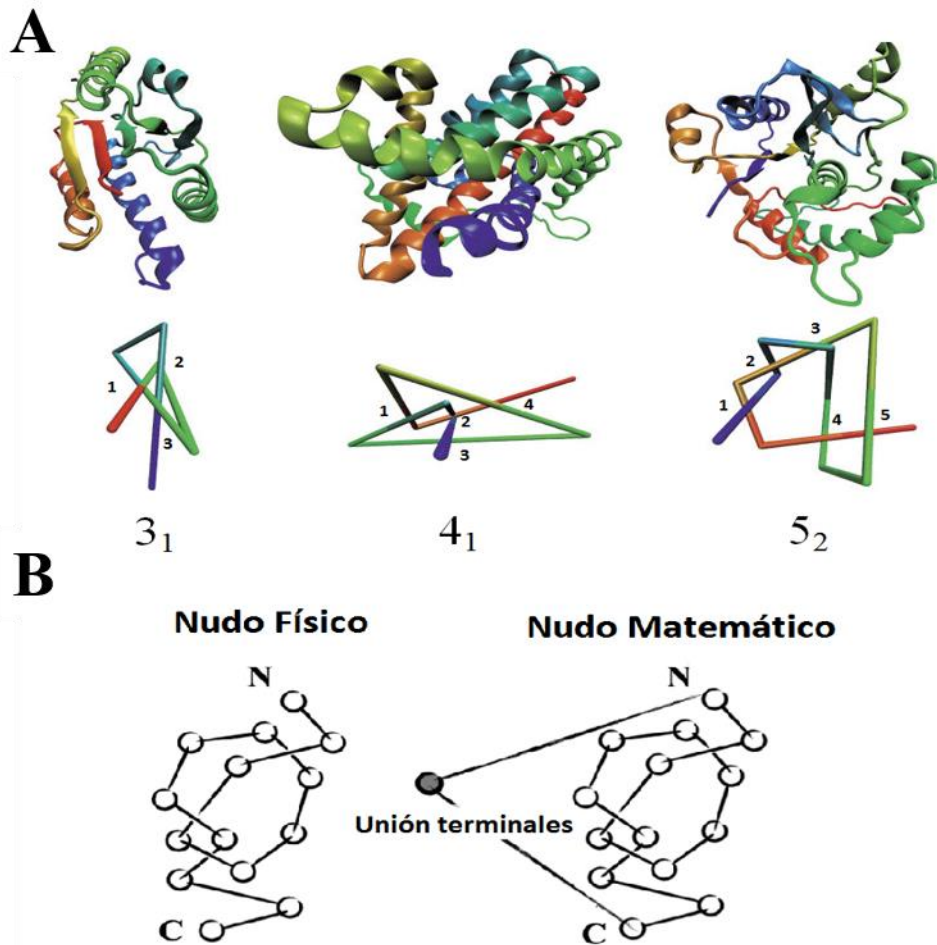
# 1. INTRODUCCIÓN

Como un marinero amarra su bote al muelle o como nosotros atamos nuestros cordones cada día, las proteínas forman nudos complejos al plegarse<sup>1-3</sup>, siendo un impresionante ejemplo de organización molecular. Hasta el año 1994 la idea de que la cadena principal de una proteína se anudara sobre sí misma no había sido seriamente considerada<sup>4</sup>, pero a medida que diversas estructuras cristalográficas de proteínas anudadas han sido depositadas en las bases de datos<sup>5,6</sup> se ha vuelto importante entender cómo estas topologías poco comunes pueden afectar las propiedades y funciones de las proteínas en la célula<sup>1,2,7</sup>. De la misma manera que los nudos cumplen funciones en nuestras vidas o la dificultan, como cuando los cables se enredan, los polímeros aminoacídicos anudados podrían tener propiedades únicas muy distintas a su contraparte desanudada. Recientes estudios *in silico* sugieren que estas topologías complejas pueden interferir en procesos biológicos asociados a fuerza mecánica, como la translocación de proteínas, en donde los nudos podrían obstruir el paso de estas proteínas a través de poros estrechos<sup>2,8,9,10</sup>. En la presente tesis se pretende dilucidar si los nudos pueden dificultar un proceso asociado a la translocación como es la degradación de proteínas por proteasas dependientes de ATP. Esto permitiría explicar por qué este tipo de topologías complejas son tan escasas en la naturaleza.

## 1.1. ***Propiedades estructurales y funcionales de proteínas anudadas.***

De todas las estructuras de proteínas en el *protein data bank*<sup>11</sup> (102.013 el 2012), alrededor de 400 estructuras poseen un nudo<sup>5,12</sup>. Los nudos son formas tridimensionales que pueden adoptar las cuerdas<sup>13,14</sup>. Al igual que una cuerda, es posible determinar si la cadena principal de una proteína está anudada simplemente al tirar de sus terminales en direcciones opuestas, si la proteína posee un nudo este se apretará<sup>15</sup>. Se han descrito cuatro tipos de nudos en proteínas: el nudo 3<sub>1</sub>, 4<sub>1</sub>, 5<sub>2</sub> y 6<sub>1</sub><sup>2,3,16</sup> (Fig.1A) siendo el primer número la cantidad cruces de la cadena principal sobre sí en su proyección planar y el segundo representa al tipo de nudo indescomponible con el mismo número de cruces<sup>8</sup>. Por definición matemática los nudos se





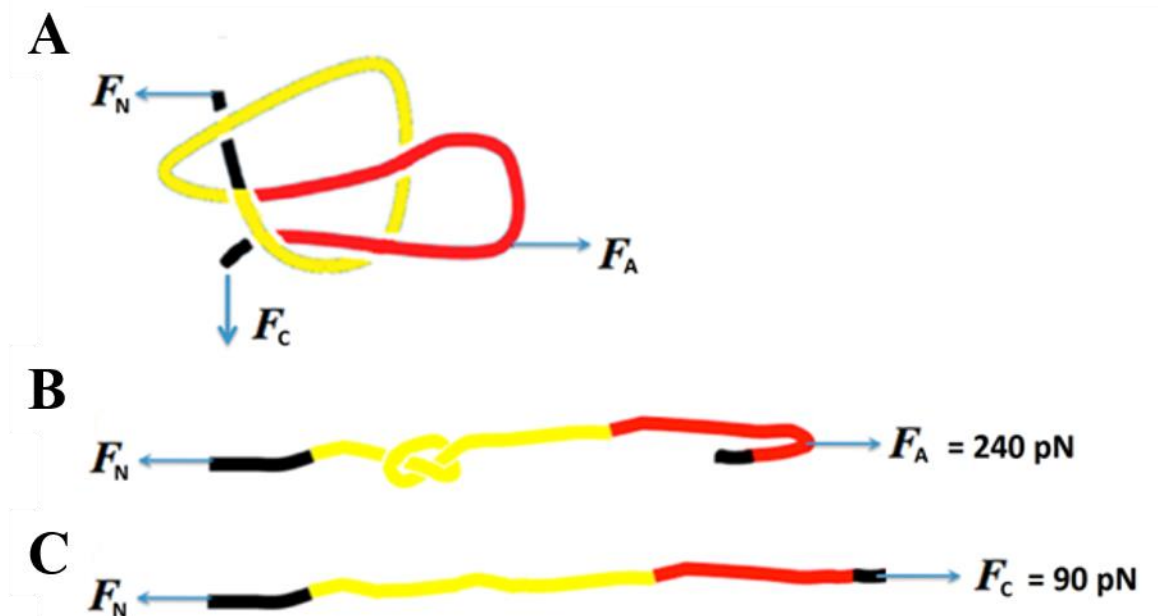
**Figura 1. Topologías anudadas presentes en proteínas.** A) Ejemplo de los tipos de nudos presentes en proteínas el nudo  $3_1$  de la metil transferasa YbeA (PDB ID: 1NS5), el nudo  $4_1$  de la Cetol- ácido reductoisomerasa (PDB ID: 1YVE) y el nudo  $5_2$  de la Ubiquitina Hidrolasa Humana (PDB ID: 1XD3). B) Nudos físicos (cuerdas abiertas) y nudos matemáticos (cuerdas cerradas)

definen en cuerdas cerradas<sup>13,14</sup>, las proteínas al ser cuerdas abiertas forman "nudos físicos" los cuales se pueden desanudar sin necesidad de cortar su cadena principal<sup>12</sup> (Fig.1B).

Si los nudos en proteínas cumplen alguna función importante o si son curiosidades accidentales aún no ha sido completamente esclarecido. No obstante, la conservación estricta de patrones anudados complejos dentro de familias de proteínas, sugiere que el anudamiento de la cadena polipeptídica cumple un rol en su función<sup>2,12,17</sup>. Varios estudios apuntan a que los nudos podrían otorgar rigidez, termoestabilidad y resistencia mecánica<sup>18-25</sup>. Por ejemplo, en el caso de la familia de las ARN metiltransferasas, de bacterias termófilas, el núcleo del nudo  $3_1$  forma el sitio de unión al cofactor S-adenosil metionina<sup>18,19</sup> y en un fitocromo fotorreceptor le brinda la rigidez necesaria para fijar y proteger del solvente a su cromóforo<sup>20</sup>. En el caso de la anhidrasa carbónica II, muestra una mayor termoestabilidad y resistencia a la agregación a medida que

forma nudos de mayor complejidad<sup>21</sup>. También, se ha observado que las topologías anudadas confieren mayor resistencia al desplegamiento mecánico. Experimentos de microscopía de fuerza atómica y dinámicas moleculares han mostrado que varias proteínas con nudos tipo 3<sub>1</sub> (anhidrasa carbónica B<sup>22</sup>, N-acetil-ornitin-transcarbamilasa<sup>23</sup> y la proteína AFV3-109<sup>24,25</sup>) requieren de fuerzas de mayor magnitud cuando son desplegadas estirándolas de manera de apretar el nudo (Fig.2B) que cuando son desplegadas de manera que la cadena polipeptídica se extienda completamente a su configuración desanudada (Fig.2C).

Estas cualidades sugieren que las topologías anudadas otorgan algunas ventajas respecto a las proteínas sin nudos y por lo tanto podrían estar altamente representadas en la naturaleza. En efecto, distintos modelos poliméricos predicen que al compactar aleatoriamente un polímero con el mismo diámetro y flexibilidad de una cadena polipeptídica la probabilidad de encontrar un nudo es de 50% y 90% para una proteína de 400 y 900 aminoácidos, respectivamente<sup>26,27</sup>. Sin embargo, las proteínas anudadas son sólo un 0,5% del total de las estructuras depositadas en el PDB<sup>12</sup>, lo que es órdenes de magnitud menor a lo predicho. En consecuencia, se ha propuesto que las proteínas con topologías anudadas han sido seleccionadas negativamente durante la evolución, siendo las remanentes fósiles vivientes cuyas propiedades pueden explicar por qué han ido desapareciendo.

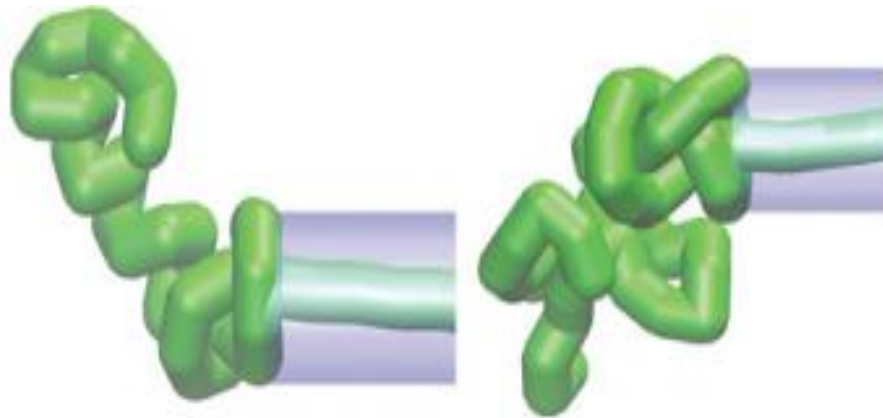


**Figura 2. Topologías anudadas y resistencia al desplegamiento mecánico.** A) Proteína AFV3-109 puede desplegarse mecánicamente como B) una proteína anudada<sup>25</sup> o C) una proteína no anudada<sup>24</sup>. La fuerza requerida para desplegarla es mayor al apretar el nudo que al desatar la cadena polipeptídica.

Se ha propuesto que la baja frecuencia de proteínas anudadas se debe al complejo mecanismo de plegamiento que deben experimentar estas proteínas para alcanzar su estructura nativa<sup>28-30</sup>. Según la teoría topocéntrica o nativo céntrica del plegamiento de las proteínas, la complejidad topológica es el principal factor que afecta la velocidad de plegamiento<sup>31,32</sup>. En el caso de proteínas con nudos simples tipo 3<sub>1</sub>, se requiere que en algún punto de su plegamiento, uno de extremos terminales se enhebre a través de una horquilla formada por su cadena principal<sup>33</sup>. Este requerimiento disminuye el número de rutas hacia el estado nativo disminuyendo la velocidad de plegamiento<sup>34</sup>. Si bien experimentos traducción *in vitro*<sup>35</sup> y simulaciones moleculares<sup>29,30,34</sup> muestran que la formación de un nudo es el paso limitante en el plegamiento, el proceso completo puede ocurrir de manera espontánea y en escalas de tiempo biológicamente compatibles<sup>35</sup> o similares a proteínas sin nudos<sup>36</sup>. Más aún, las proteínas diseñadas con nudos artificiales son capaces desplegarse con constantes de plegamiento relativamente rápidas<sup>37</sup> de 0,9 s<sup>-1</sup>. De esta manera, la formación de un nudo no es un impedimento suficiente en el plegamiento de estas proteínas que explique su baja representación en la naturaleza.

¿Entonces, a que se debe que estas topologías sean tan escasas? Estudios de estabilidad indican que los nudos en proteínas son configuraciones metaestables que pueden permanecer en presencia de elevadas concentraciones de agentes caotrópicos<sup>35,38</sup>. En el caso de dos ARN metiltransferasas tipo  $\alpha/\beta$ -knot cuya estructura presenta un nudo tipo 3<sub>1</sub>, se ha observado que el nudo permanece en su estado desplegado inducido por elevadas concentraciones de Urea<sup>38</sup>. Más aún, el estado desplegado anudado puede permanecer por meses en algunas proteínas<sup>39</sup>. En consecuencia, los nudos en cadenas polipeptídicas pueden funcionar como una trampa cinética que impide que el estado desplegado se desanude. Dada esta increíble persistencia de los nudos en proteínas, se abre la posibilidad de que estos puedan dificultar ciertos procesos biológicos que requieran del desanudado de la cadena polipeptídica. Por ejemplo, la velocidad de translocación de diversos polímeros a través de poros disminuye si estos están anudados<sup>40,41</sup>. Esto se debe a que al tirar un polímero anudado de un extremo el nudo comienza a apretarse, generando una creciente fuerza de fricción. Esta fuerza puede impedir que el nudo se mueva y si el poro es de menor diámetro que el del nudo apretado, la translocación se detendrá. De manera similar, se ha propuesto que los nudos presentes en cadenas polipeptídicas pueden obstruir su paso a través de orificios estrechos, como los presentes en los poros mitocondriales, sistemas de secreción o proteasas dependientes de ATP como el proteosoma<sup>2,8,9,10</sup> (Fig.3). La

proteína anudada que ha generado mayor especulación al respecto es la ubiquitina hidrolasa humana. Esta enzima se encarga de rescatar proteínas marcadas con ubiquitina de la degradación por el proteosoma. A pesar del constante contacto y la formación de complejos con la ubiquitina esta enzima no es degradada por el proteosoma, ni siquiera cuando es poli-ubiquitinizada<sup>42</sup>. Dado que esta enzima presenta un nudo complejo  $5_2$ , se ha postulado que el nudo le brindaría esta resistencia a la degradación<sup>2</sup>. Estudios recientes han mostrado que el nudo en un homólogo de esta proteína le brinda estabilidad mecánica y que al estirarla en pinzas ópticas forma un nudo apretado de un diámetro mayor al poro del proteosoma<sup>43</sup>. Si bien estos antecedentes son sugerentes, aún no se ha determinado experimentalmente si las topologías anudadas dificultan procesos biológicos asociados a la translocación. La translocación de proteínas es vital para la célula, se estima que más de un 50% de las proteínas debe ser translocada para cumplir su función<sup>44</sup>. Determinar si las topologías anudadas interfieren con estos procesos podría ofrecer una nueva explicación de por qué estas topologías han sido desfavorecidas.



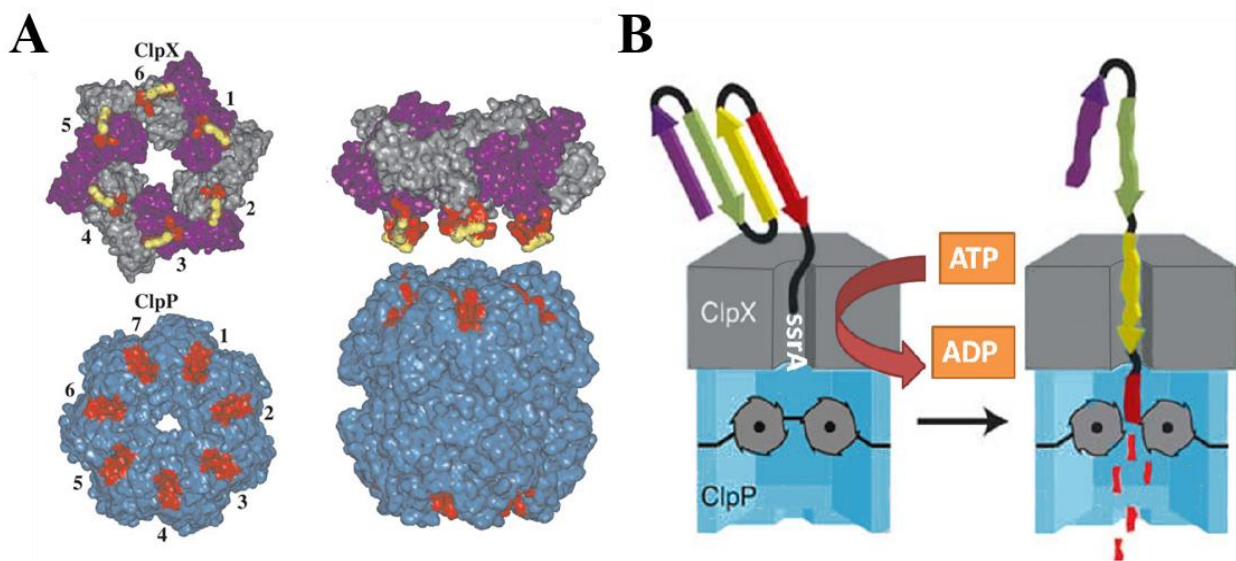
**Figura 3. Topologías anudadas en proteínas pueden obstruir poros.** Resultados de dinámicas moleculares de translocación de polipéptidos anudados (verde) al pasar por un poro de 13 Å de diámetro (azul). A la izquierda un nudo tipo  $3_1$  y a la derecha un nudo tipo  $4_1$  <sup>10</sup>.

### 1.2. *Proteínas anudadas como sustratos de proteasas dependiente de ATP.*

El correcto mantenimiento y la regulación de los niveles de cada proteína, denominado proteostasis, es fundamental para la viabilidad celular. De esta forma, todas las células han desarrollado un sistema de control de calidad de proteínas, conformado por varias chaperonas y

proteasas dependientes de ATP<sup>45</sup>. En este sistema, el rol de las proteasas es fundamental, ya que permite degradar proteínas mal plegadas, dañadas o cuya función ya no se requiere<sup>45</sup>.

Las proteasas dependientes de ATP se encargan de más del 90% de la degradación de proteínas en bacterias y en el citoplasma de eucariontes <sup>46</sup>. Distintas proteasas dependientes de ATP degradan diferentes proteínas y regulan distintos procesos fisiológicos, pero todas comparten una arquitectura común y un modo de acción similar<sup>47</sup>. Entre las más estudiadas se encuentra ClpXP, una proteasa bacteriana que se ha utilizado como modelo para determinar el mecanismo por el cual este tipo de proteasas degradan sus sustratos<sup>48</sup>. ClpXP es un complejo oligomérico en forma de barril compuesto por la desplegasas ClpX que forma un anillo homohexamérico que se une al complejo de catorce subunidades de la serina proteasa ClpP<sup>49</sup> (Fig.4A). ClpX pertenece a la familia de las proteínas AAA+ (ATPasas Asociadas a múltiples Actividades), las cuales convierten la energía química del ATP en trabajo mecánico que ejercen sobre sus sustratos macro moleculares<sup>45,47,48</sup>. ClpX reconoce de manera específica varias secuencias peptídicas cortas y desestructuradas de sus sustratos, llamadas degrones<sup>45</sup>. El degrón más utilizado es la señal *ssrA*, un péptido de 11 aminoácidos que ha facilitado los estudios de esta proteasa, ya que es posible generar un nuevo sustrato de ClpXP simplemente agregando la secuencia *ssrA* al extremo carboxilo terminal de la proteína a degradar <sup>50,51</sup>.



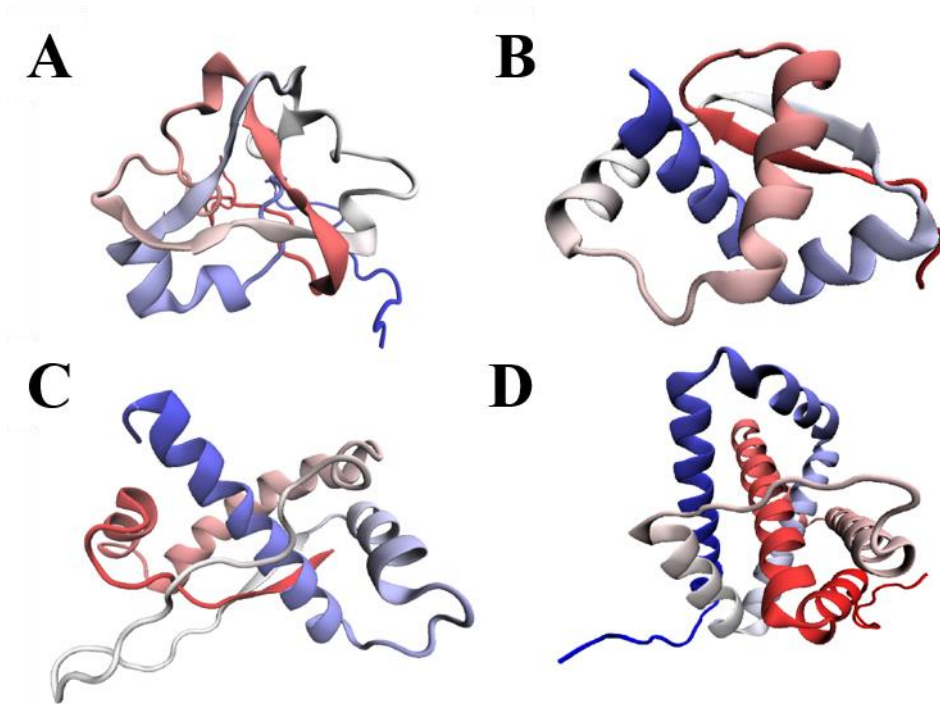
**Figura 4. Estructura y función de la proteasa ATP dependiente ClpXP.** A) Un Hexámero de ClpX y un 14amero de ClpP forman un complejo oligomérico en forma de barril, con un poro central. Con rojo se destaca los sitios de unión de ClpX a ClpP.<sup>49</sup> B) Mecanismo de desdoblamiento y translocación de proteínas sustrato por ClpX, seguido de su proteólisis mediada ClpP.<sup>47</sup>

### 1.2.1. *Factores estructurales de proteínas anudadas y su relación con la velocidad de degradación mediada por ClpXP.*

ClpX despliega mecánicamente a sus proteínas sustrato tirándolas desde su degrón y forzándolas a pasar a través de su estrecho poro central de 10-12 Å de diámetro<sup>52</sup>. El desplegamiento del polipéptido es seguido por su translocación hacia la cavidad del componente proteasa (ClpP) en donde es proteolizado a pequeños péptidos<sup>47,48,53</sup> (Fig.4B). A pesar de que ClpXP es una enzima oligomérica, cinéticas de velocidad en función de la concentración de sus sustratos (proteínas y ATP) siguen un comportamiento hiperbólico<sup>54</sup>. En consecuencia, sus parámetros cinéticos como  $k_{cat}$  y  $K_M$ , pueden ser determinados utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. En general la  $K_M$  para el sustrato proteico es independiente de la estructura del sustrato y tiene valores cercanos a 1  $\mu\text{M}$ <sup>54,55</sup>. Por el contrario, la constante catalítica determinada en función de la proteína sustrato ( $k_{deg}$ ) es altamente dependiente de la estructura de la proteína sustrato y su valor es un indicador de la resistencia de un sustrato frente a la degradación por ClpXP<sup>53</sup>. En experimentos enzimáticos *in vitro* realizados con muchas moléculas o en *in multiplo* la constante catalítica observada de ClpXP ( $k_{deg}$ ) corresponde al aporte de los procesos de desplegamiento ( $k_{des}$ ) y translocación ( $k_{trans}$ ):  $1/k_{deg}=1/k_{des}+1/k_{trans}$ <sup>53</sup>. En esta tesis se sugiere que las proteínas con topologías anudadas son un especial desafío para ClpXP debido que podrían afectar tanto los procesos de desplegamiento ( $k_{des}$ ) como de translocación ( $k_{trans}$ ) de ClpXP.

Como regla general proteínas con mayor resistencia al desplegamiento mecánico muestran-menores velocidades de degradación por ClpXP<sup>53</sup>, en clara analogía con el proceso de desplegamiento mecánico vectorial que experimentan los sustratos de ClpXP. Por otra parte, diversos estudios realizados mediante microscopía de fuerza atómica<sup>20,24,25</sup> o pinzas ópticas<sup>43</sup> indican que los nudos pueden otorgar resistencia al desplegamiento mecánico y por lo tanto ser estructuras especialmente resistentes al desplegamiento inducido por ClpXP. Sin embargo, la capacidad de ClpXP para desplegar sus sustratos también depende en gran medida de la estabilidad local y el contexto estructural en que se encuentre la señal *ssrA*<sup>53,55</sup>. Por ejemplo, el dominio I27 de Titina (una proteína no anudada) muestra diferentes velocidades de degradación en función de mutaciones realizada en la hebra  $\beta$  más cercana a la señal *ssrA*. Mutaciones que desestabilizan esta hebra  $\beta$  generan un incremento de la velocidad de degradación por ClpXP, lo cual no ocurre al desestabilizar zonas alejadas de la señal *ssrA*<sup>53</sup>. Por lo tanto, para correlacionar menores velocidades de degradación con la presencia de una topología anudada,





**Figura 5. Estructura de proteínas anudadas propuestas como sustratos de ClpXP. A)** Rds3p (PDB ID: 2k0a) **B)** MJ0366 (PDB ID: 2efv) **C)** VirC2 (PDB ID: 2rh3 ) **D)** HP0242 (PDB ID: 2bo3 )

se debe evaluar la misma topología anudada en distintos contextos estructurales. Por ello, para determinar si la presencia de un nudo *per se* es responsable de la resistencia a la degradación en este tipo de proteínas, se propone estudiar la degradación *in vitro* de distintas proteínas anudadas, todas con nudos  $3_1$  (Fig.5).

La eficiencia de la translocación mediada por ClpXP también puede ser afectada por las topologías anudadas. Simulaciones moleculares de proteínas anudadas tipo  $3_1$  han predicho que al estirar sus extremos<sup>8,56,57</sup> o al forzar su paso a través de poros<sup>9,10</sup>, el nudo puede apretarse hasta alcanzar un estado incompresible de 16 Å de diámetro, el cual es incapaz de deslizarse (no es difusivo) y pasar a través de un poro de 13 Å de diámetro (Fig.3). Tomando en cuenta que la estructura cristalográfica de ClpXP presenta poro de 10-12 Å de diámetro<sup>52</sup>, es plausible que un nudo apretado también detenga la translocación mediada por ClpXP. En consecuencia, la formación de nudos incompresibles no difusivos puede disminuir la velocidad de translocación de ClpXP hasta detenerla. Sin embargo, se ha observado que ClpXP es capaz de translocar simultáneamente dos o tres cadenas polipépticas<sup>58</sup> lo que sugiere que el poro de ClpX puede expandirse hasta 20 Å. Por lo tanto, se requiere evidencia experimental para determinar si las proteínas anudadas pueden disminuir la velocidad de translocación o detenerla al obstruir el

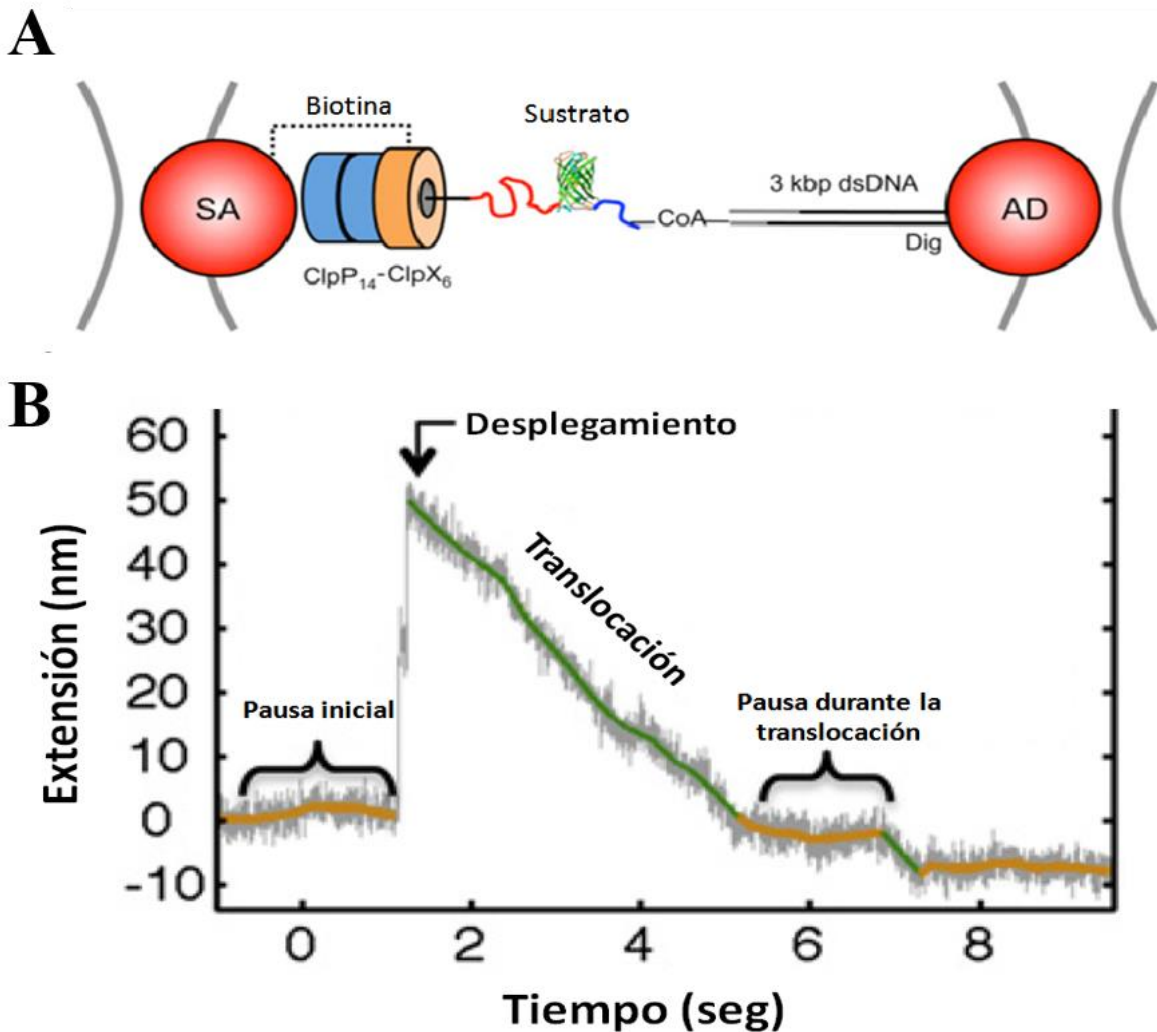
poro de ClpXP. Se ha observado que cuando ClpXP se enfrenta a proteínas o dominios que no puede translocar libera productos parcialmente degradados<sup>55,59</sup>. Si el nudo es una estructura que ClpXP no puede translocar, también debería generar productos parcialmente degradados. En esta tesis se evaluó si la degradación *in vitro* de proteínas anudadas genera productos parcialmente degradados mediante geles de SDS-PAGE, MALDI y cromatografía de exclusión molecular.

### 1.2.2. *Análisis de los procesos de desplegamiento y translocación observados mediante experimentos de moléculas individuales.*

Los valores de  $k_{deg}$  entregan información sobre el tiempo promedio que ClpXP se demora en degradar un sustrato pero no permiten analizar el proceso de desplegamiento y translocación de manera independiente. Algunos estudios *in multiplo* han estudiado el proceso de translocación de ClpXP utilizando sustratos desplegados. En este caso la constante de degradación observada es muy similar a la velocidad de translocación de ClpXP<sup>53,55</sup>. Sin embargo, esta aproximación no puede ser aplicada a proteínas con topologías anudadas debido a que es difícil determinar si el nudo se mantiene presente en el polipéptido desplegado<sup>38</sup>. Analizar separadamente los procesos de desplegamiento y translocación es fundamental para determinar en qué etapa (desplegamiento o translocación) los nudos tienen un mayor impacto.

En el laboratorio del Dr. Carlos Bustamante (Universidad de California, Berkeley) se ha construido un sistema experimental que permite estudiar los procesos de desplegamiento y translocación separadamente mediante pinzas ópticas de alta resolución con doble trampa óptica (alta resolución)<sup>60-62</sup>. Como se observa en la figura 6A, ClpXP es inmovilizada en la superficie de una esfera de poliestireno mientras que sus sustratos se unen a una segunda esfera<sup>60</sup>. Estas esferas son capturadas por trampas ópticas generadas por un rayo láser, el cual crea un potencial que mantiene a las esferas en su foco<sup>63</sup>. Debido a que el cambio en la posición de la esfera con respecto al foco del láser cambia la dirección en que los fotones son refractados por esta, es posible determinar la posición de cada esfera determinando la desviación de los fotones refractados<sup>63</sup>. Por lo tanto, esta metodología permite registrar los cambios en la distancia entre ambas esferas cuando ClpXP reconoce, tira, despliega y transloca al sustrato<sup>60-62</sup>. Por ejemplo, en la trayectoria de degradación de GFP en la figura 6B, el desplegamiento de GFP es caracterizado por un abrupto incremento de la extensión. Esto se debe a que la cadena





**Figura 6. Ensayos de degradación a nivel de molécula individual.** A) Configuración del ensayo de degradación en pinzas ópticas de doble trampa. ClpXP es biotinilada e inmovilizada sobre una esfera de poliestireno recubierta con estreptavidina y sus sustratos se unen a una segunda esfera de poliestireno mediante una hebra de ADN. Luego estas esferas son inmovilizadas en trampas ópticas B) Trayectoria de desplegamiento y translocación del sustrato GFP-ssrA.<sup>60</sup>

polipeptídica de GFP se extiende abruptamente al desplegarse debido a que todo el sistema está en tensión. La duración de la pausa inicial (previa al desplegamiento) refleja el número de intentos que requiere ClpXP para desplegar a su sustrato, y es una medida de la resistencia que ejerce su estructura frente a la perturbación mecánica de ClpXP<sup>60</sup>. El tiempo transcurrido durante la pausa inicial está relacionado directamente con la constante de desplegamiento ( $k_{des}$ ) del sustrato por ClpXP. Luego del desplegamiento ocurre una disminución paulatina de la distancia, lo cual corresponde al proceso de translocación del polipéptido desplegado y cuya pendiente corresponde a la velocidad de translocación<sup>60</sup>. Durante la translocación se pueden

observar algunas pausas en donde ClpXP puede detenerse por unos segundos, la cantidad de pausas es dependiente de la fuerza de oposición aplicada a ClpXP <sup>60</sup>. Se determinó si las topologías anudadas incrementan el tiempo requerido para desplegar la proteína (pausas iniciales) y/o disminuyen la velocidad de translocación.

Conocer el mecanismo de degradación de las proteínas anudadas mediado por ClpXP, permitirá determinar si estas complejas topologías dificultan procesos biológicos asociados a la translocación y comprender porque estas topologías son tan escasas en la naturaleza. También, este modelo de estudio ofrece una oportunidad de estudiar experimentalmente el comportamiento de los nudos en cuanto a su habilidad de difundir y de apretarse en una cadena polipeptídica.

## **2. HIPÓTESIS**

Las topologías anudadas dificultan la degradación de proteínas mediada por la proteasa ATP dependiente ClpXP, obstruyendo el proceso de translocación.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. *Objetivo General:***

Determinar el mecanismo de desplegamiento y translocación de proteínas con topologías anudadas, tipo  $3_1$ , mediado por la proteasa dependiente de ATP ClpXP de *E. coli*.

### **3.2. *Objetivos específicos:***

- 1) Determinar si la topología anudada tipo  $3_1$  es un factor que confiere resistencia a la degradación de proteínas mediada por ClpXP.
- 2) Determinar mediante pinzas ópticas de doble trampa el mecanismo de desplegamiento y translocación de proteínas con topologías anudadas por ClpXP.

## 4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 4.1. *Reactivos e Insumos.*

Reactivo	Marca	N° de catálogo
Acrilamida	Amresco	341
Agar-Agar	Merck	1.01614.1000
Agarosa	Bioline	BIO-41026
Amortiguador de carga de ADN 6X	Thermo Scientific	R061
Ampicilina	USBiological	A2260
ATP	Sigma	A26209-5G
Biotina	Thermo Scientific	29129
BirA	Sigma	SRP0417
Bis-acrilamida	Amresco	1725
$\beta$ -Mercaptoetanol	Winkler	BM-1200
Cloruro de Guanidinio	Winkler	BM-0845
Cloruro de sodio	Merck	109945
Cloruro de Potasio	Merck	1.04936.1000
Cloruro de Magnesio	Merck	1.05833.0250
Coomassie Brilliant blue G250	Merck	1.15444.0025
Creatina fosfato	Sigma	27920-1G
Creatina quinasa	Sigma	C7886-1KU
DNasa I	Roche	10104159001
dNTP	Bioline	BIO-39025
DTT	Calbiochem	3860
EDTA	Merck	1.08418.1000
Estándar de peso molecular de ADN (1 kb)	Thermo Scientific	SM0313
Estándar de peso molecular de proteínas, preteñido.	Thermo Scientific	26616
GelRed	Biotium	BI.41002
Glicerol (85%)	Merck	1.04094.1000
HEPES	Merck	391340
Imidazol	USBiological	C9101551
IPTG	Bioline	BIO-37036
Ligasa T4	New England Biolabs	NEB #M0202
Lisozima de huevo de pollo	Sigma	L6876
Medio de cultivo LB Broth	MO BIO	12106-1
Persulfato de amonio	Amresco	0486-25G
PMSF	Sigma Aldrich	78830
Polimerasa Pfu	Agilent	ST.600670
Polimerasa Taq	Thermo Scientific	10342020
SDS	Merck	1.13760.0100
Sfp	Sigma	P9302S
Tris base	Calbiochem	9210

## 4.2. *Metodología.*

### 4.2.1. **Procedimientos generales:**

***Subclonamiento sustratos anudados:*** Los sustratos anudados para ClpXP fueron generados insertando los genes de las proteínas anudadas en un plasmidio pET21d y agregando las secuencias para seis histidinas y la señal de degradación *ssrA* en su extremo 5' (extremo C-terminal, secuencia: AANDENYALAA). Para el caso de los sustratos multidominio, se agregó en el extremo 3' de los genes de las proteínas anudadas el gen de la proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* (GFP), la cual ha sido exhaustivamente estudiada como sustrato de ClpXP<sup>54,60,64</sup>. Para generar los sustratos para pinzas ópticas se agregó el dominio I27 de Titina en el extremo 5' de los genes de las proteínas anudadas. Los subclonamientos se realizaron mediante corte y empalme de fragmentos de ADN generados por enzimas de restricción (ThermoScientific™ FastDigest™) (Fig.7). Los productos de la reacción de digestión fueron separados según su peso molecular por electroforesis gel al 1% de agarosa y gel según las indicaciones del kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. El plasmidio aceptor y el fragmento del gen a insertar fueron ligados utilizando T4 ligasa. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5α electrocompetentes con el producto de ligación y luego se sometieron a selección en placas de Agar-LB suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina. El ADN plasmidial de las colonias seleccionadas fue secuenciado para verificar el subclonamiento.

***Expresión y Purificación de sustratos anudados:*** Los sustratos anudados fueron expresados en la cepa *E. coli* BL21. Se crecieron las bacterias medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina a 37°C hasta llegar a un OD de 0,7. La expresión de los sustratos anudados fue inducida 3 horas a 22°C suplementando con 1 mM IPTG. Las bacterias fueron lisadas en el amortiguador Ni-A (25 mM HEPES a pH 7,6, 100 mM KCl, 400 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM β-mercapto etanol y 20 mM imidazol) suplementado con 2 mg/ml Lisosima, 10 U/ml DNAasa y 1 mM PMSF por 30 min en hielo, seguido de sonicación. Los sustratos anudados fueron purificados por cromatografía de afinidad a níquel mediante una gradiente de imidazol. Luego las fracciones con proteína fueron purificadas por cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 (10 mm) equilibrada en amortiguador Ni-A, pero sin imidazol. MJ0366-*ssrA* fue cuantificada por absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción molar calculado de 8.940 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> y los sustratos multidominio fueron cuantificados por la

absorbancia característica de GFP a 500 nm utilizando el coeficiente de extinción molar descrito en literatura<sup>65</sup> de  $54.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

**Expresión y Purificación de ClpX<sub>6</sub> y ClpP:** Los plasmidios expresión pACYCDuet-1de para ClpX y ClpP fueron una donación del Dr. Andreas Martin en el contexto de una colaboración de nuestro laboratorio con el Dr. Carlos Bustamante (Universidad de California, Berkeley). En este proyecto se utilizó la desplegas ClpX hexamérica de cadena única (ClpX<sub>6</sub>), la cual posee los seis monómeros de ClpX fusionados en una sola cadena polipeptídica, péptido aceptor de BirA (HAAGGLNDIFEAQKIEWHEDT) y seis residuos de histidina en su carboxilo terminal<sup>66</sup>. La purificación se realizó como se ha descrito previamente<sup>67</sup>, en resumen ClpX<sub>6</sub> fue expresada en la cepa *E.coli recA*<sup>-</sup> BLR (DE3), transformada con el plasmidio pACYCDuet-1 (Novagen) contenedor del gen ClpX<sub>6</sub>, e inducida con 1 mM de IPTG a OD de 0,7 por 3 horas a 22°C. Las bacterias fueron lisadas en el amortiguador Ni-A (25 mM HEPES a pH 7,6, 100 mM KCl, 400 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM β-mercaptoetanol y 20 mM imidazol) suplementado con 2 mg/ml lizosima, 10 U/ml DNAasa y 1 mM PMSF por 30 min en hielo, seguido de sonicación. ClpX<sub>6</sub> se purifico por cromatografía de afinidad a níquel mediante gradiente de imidazol y luego una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 200 (10 mm) equilibrada en amortiguador ClpX (50 mM Tris-HCl a pH 7,6, 300 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glicerol, 0,1 mM EDTA y 1 mM DTT). La proteasa recombinante ClpP, que también posee seis residuos de histidina, fue inducida, lisada (sin PMSF) y purificada por cromatografía de afinidad a níquel, de igual manera que ClpX<sub>6</sub>. Luego fue intercambiada al amortiguador ClpP (50 mM HEPES-HCl a pH 7,5, 200 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT y 10% glicerol). ClpX<sub>6</sub> y ClpP fueron cuantificadas por absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción molar de  $84.480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el hexámero de ClpX y  $125.160 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el 14amero de ClpP<sup>65</sup>.

#### 4.2.2. **Objetivo específico 1. Determinación de parámetros cinéticos para los distintos sustratos anudados:**

**Determinación de parámetros termodinámicos en condiciones de equilibrio:** Para determinar la estabilidad de MJ0366-ssrA y MJ0366-WT, se siguió el cambio de estructura secundaria por dicroísmo circular. Las mediciones fueron realizadas en condiciones de equilibrio y se utilizó cloruro de guanidinio como agente caotrópico. Todas las muestras fueron previamente incubadas por 1 hora con el agente caotrópico a 25°C en el amortiguador 30 mM Tris-HCl pH8, 6 mM fosfato de sodio pH 8, 500 mM NaCl, 1,5 % Glicerol y 1 mM DTT. La elipticidad molar

a 220 nm fue determinada en el equipo de difracción circular Jasco 1500. Se determinó la diferencia de energía entre los estados nativo y desplegado, aplicando un ajuste para un modelo de dos estados ( $N \leftrightarrow D$ ), obteniendo así la dependencia del cambio de energía libre de la transición ( $\Delta G$ ) con la concentración de agente caotrópico (valor  $m$ ) y la estabilidad de la proteína en ausencia de agente caotrópico ( $\Delta G^{H_2O}$ ).

**Intercambio de subunidades:** Todos los sustratos multidominio con un dominio de la proteína anudada MJ0366 y uno de GFP fueron incubados con MJ0366-ssrA y luego inyectados a una columna de exclusión molecular Superdex 200 (10 mm) para observar intercambio de subunidades. Los cromatogramas de los sustratos multidominio incubados con concentraciones equimolares y 8 veces mayores de MJ0366-ssrA fueron seguidos a 500 nm. El intercambio de subunidades se determinó por el cambio a mayor volumen de elución del pico cromatográfico del sustrato multidominio en presencia de MJ0366-ssrA.

**Cinéticas de degradación:** Todos los ensayos cinéticos de degradación mediados por ClpXP fueron realizados a 25°C en el amortiguador ClpX-100 (25 mM HEPES a pH 7,5, 100 mM KCl, 20 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA) en presencia de un sistema de regeneración de ATP (5 mM ATP, 16 mM creatina fosfato, y 0,032 mg/mL creatina quinasa) y ClpX<sub>6</sub> 0,3  $\mu M$  y ClpP<sub>14</sub> 1,5  $\mu M$ .<sup>60</sup> Los ensayos fueron iniciados mediante la adición de las proteínas sustrato. Las cinéticas de degradación de los sustratos con un dominio de GFP, fueron seguidas por fluorescencia total a 511 nm (excitación 467 nm) en un espectro-fluorímetro Agilent Cary Eclipse o por fluorescencia en gel SDS-PAGE. Para los ensayos en gel se tomaron alícuotas de la reacción de degradación a distintos tiempos y se detuvieron en amortiguador de carga Laemmli (2% SDS), luego se cargaron en un gel SDS-PAGE sin ser calentadas para retener la fluorescencia de GFP<sup>68</sup>. Las bandas con fluorescencia de GFP se revelaron en un transiluminador UV modelo ECX-20M. Las cinéticas de los sustratos sin GFP fueron seguidas en geles de SDS-PAGE mediante tinción Coomassie Brilliant blue G-250. Las bandas fluorescentes como las obtenidas por tinción de Coomassie fueron cuantificadas por densitometría utilizando el software GelAnalyzer<sup>69</sup>.

**Ensayos de competencia:** Se realizaron cinéticas de degradación seguidas fluorescencia total a 511 nm (excitación 467 nm) del sustrato GFP-ssrA en presencia de sustratos anudados multidominio. Para ello se mantuvieron las condiciones de degradación ya descritas y se inició la reacción suplementando con 0-1,5  $\mu M$  de sustrato anudado y 1  $\mu M$  de GFP-ssrA. La

competencia de ambos sustratos por la proteasa ClpXP se determinó por la disminución en la velocidad de degradación de GFP-ssrA en presencia de los sustratos anudados. Los sustratos anudados poseen una señal de corte para la proteasa TEV<sup>70</sup> que permite escindir la señal ssrA. Para determinar que los sustratos anudados son reconocidos por el ssrA, fueron preincubados por 3 horas con la proteasa TEV y luego se utilizaron estos sustratos sin el ssrA en ensayos de competencia con GFP-ssrA.

***Cuantificación y caracterización de productos de degradación parcial:*** Los porcentajes de degradación parcial de los sustratos multidominio fueron determinados por cromatografía de exclusión molecular, mediante la comparación de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos a 500 nm (absorbancia de GFP) a tiempo 0 y luego de dos horas de degradación. Los productos de degradación parcial no pudieron ser cuantificados por fluorescencia en gel, debido a que la banda correspondiente a estos productos mostró claras señales de apagamiento según el tiempo de exposición a la luz UV. El tamaño de los productos de degradación parcial fue determinado por espectrometría de masas MALDI-TOF. Se mezcló 1  $\mu$ L de una dilución 1:10 de la reacción de degradación con 1  $\mu$ L de la matriz ácido sinapínico (SA: preparada a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0,1% v/v 1:2) en una placa porta muestra micro Scout. La adquisición de espectros de masas se realizó en un equipo MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA) en modo ion positivo mediante detección lineal.

#### **4.2.3. Objetivo específico 2. Montaje del ensayo de degradación en pinzas ópticas para el estudio, a nivel de molécula individual, del desplegamiento y translocación de proteínas anudadas por ClpXP:**

Los ensayos a nivel de molécula única fueron realizados en una pinza óptica de doble trampa con detección diferencial en el laboratorio del Dr. Carlos Bustamante (Universidad de California, Berkeley)<sup>60</sup>. Los ensayos de degradación en pinzas ópticas requieren formar dos complejos: **1)** ClpXP unido, mediante una etiqueta biotina, a una esfera de poliestireno recubierta con estreptavidina y **2)** el sustrato anudado a una segunda esfera de poliestireno recubierta con anti-digoxigenina (Fig.6A). La unión entre el sustrato anudado y la esfera se realiza mediante un hebra doble de ADN marcada con digoxigenina. Los hexámeros de cadena única de ClpX fueron biotinilados mediante el uso de la enzima BirA, incubando a 30°C por 45 minutos 10  $\mu$ M de ClpX en 50 mM Tris HCL a pH 8,3, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 0,045



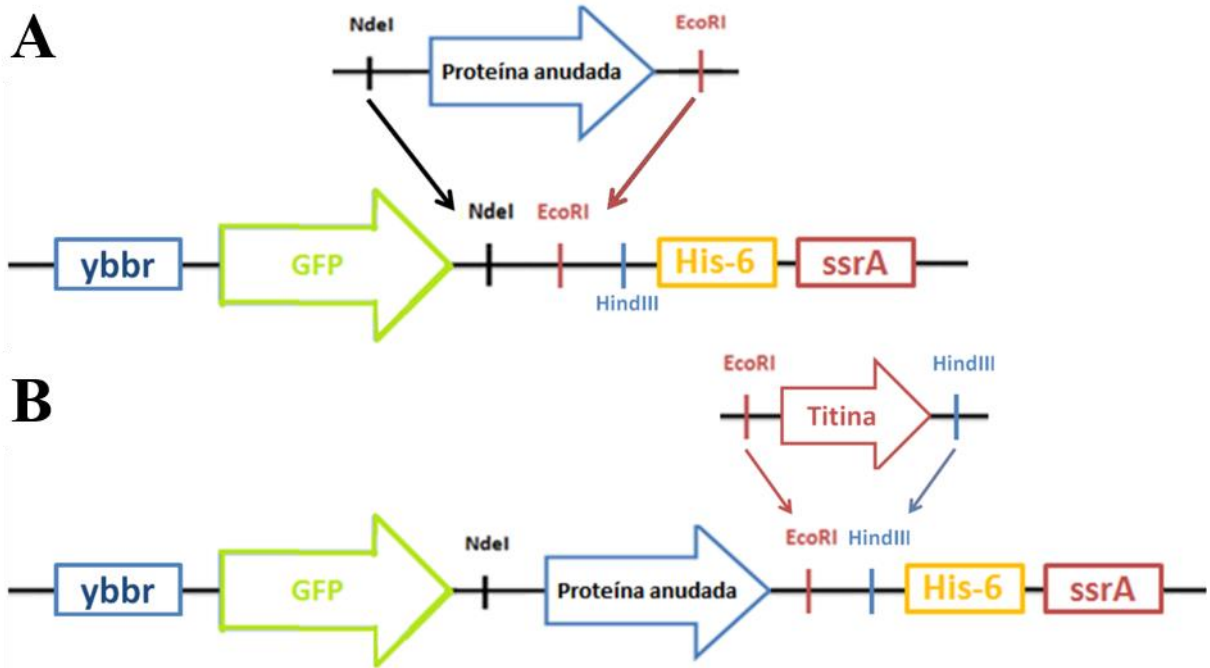
mg/ml biotina y 0,8  $\mu\text{M}$  BirA<sup>71</sup>. El complejo final es formado incubando 10 minutos ClpX<sub>6</sub> biotinilado con esferas recubiertas con estreptavidina. La unión de los sustratos anudados a las esferas de poliestireno se realizó en tres pasos<sup>60</sup>:

1) Se unió un oligonucleótido, marcado con coenzima A (CoA), al amino terminal del sustrato anudado mediante el sistema ybbR/Sfp, donde Sfp une covalentemente la coenzima A a la primera serina del péptido señal ybbR (en el extremo N-terminal del sustrato, secuencia: DSLEFIASKLA)<sup>72</sup>. Para ello las muestras se incubaron a 30°C por 90 minutos utilizando 25  $\mu\text{M}$  de sustrato con 50  $\mu\text{M}$  del CoA-oligo y 5  $\mu\text{M}$  Sfp en 50  $\mu\text{M}$  HEPES a pH 7,5 suplementado con 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Luego el complejo sustrato-CoA-Oligo fue purificado por cromatografía de afinidad a Ni<sup>2+</sup>, los 200  $\mu\text{l}$  obtenidos fueron dializados por 4 horas contra 1 litro del amortiguador ClpX-100.

2) Ligación del complejo sustrato-oligo a un fragmento de ADN de 3 kb modificado con digoxigenina<sup>73</sup>. El fragmento de ADN fue generado por PCR con Taq polimerasa y luego purificado según las indicaciones del kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. El fragmento de 3 kb fue digerido con la enzima de restricción BbsI por 14 horas a 37°C y luego purificado en gel purificado según las indicaciones del kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. En el fragmento de 3kb BbsI genera un extremo cohesivo complementario al CoA-Oligo. Esto permite ligar al sustrato modificado con el CoA-Oligo al fragmento de 3kb ADN utilizando la T4 ligasa. La ligación se realizó en 5  $\mu\text{l}$  totales agregando 1  $\mu\text{l}$  de T4 ligasa 25 nmoles del fragmento de 3kb ADN y 400 nmoles de sustrato-CoA-Oligo.

3) Incubación del sustrato-CoA-Oligo-3kb ADN con las esferas recubiertas con anticuerpos anti-digoxigenina por 10 minutos a 4°C.

Tanto las esferas unidas a ClpXP como las unidas al sustrato fueron diluidas 1000 veces en el amortiguador ClpX-100 en presencia del sistema de regeneración de ATP y suplementado con 1,5  $\mu\text{M}$  ClpP<sub>14</sub>. Luego fueron inyectadas a la cámara de reacción mediante jeringas controladas por pistones eléctricos. Las esferas fueron capturadas manualmente en las trampas ópticas y se dio inicio a la reacción acercando y alejando las esferas hasta observar una fuerza de tensión entre ambas mayor o igual a 5 pN. Una vez comenzada la reacción las trampas se mantienen a una distancia constante y se registra los cambios en la distancia entre las esferas.



**Figura 7. Subclonamiento sustratos anudados multidominio para ClpXP.** A) Sustratos multidominio para ensayos de degradación seguidos por fluorescencia y B) sustratos multidominio para ensayos de degradación en pinzas ópticas

## **5. RESULTADOS**

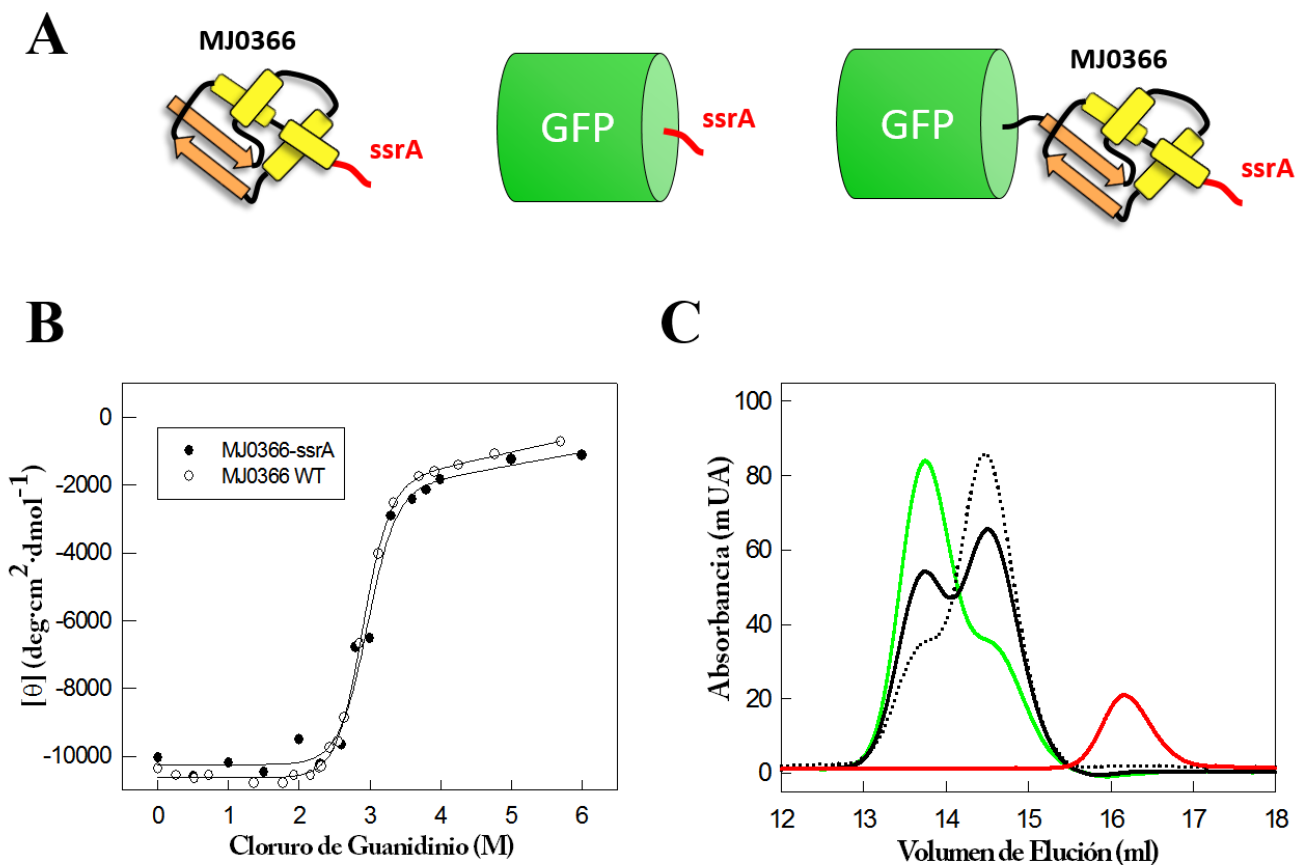
### **5.1. *Objetivo específico 1.***

#### **5.1.1. *Sustratos anudados.***

Se generaron cuatro sustratos multidominio agregando GFP en el extremo N-terminal y el péptido señal *ssrA* en el extremo C-terminal de cuatro proteínas que presentan un nudo tipo 3<sub>1</sub>. De los cuatro sustratos, sólo dos pudieron expresarse, purificarse y ser reconocidos por ClpXP (Fig.S1, página 53). El sustrato anudado multidominio GFP-MJ0366-*ssrA* fue el que mostró mayor resistencia a la degradación mediada por ClpXP y por ello los experimentos se enfocaron en la degradación de sustratos con dominios de MJ0366. MJ0366 posee un nudo tipo 3<sub>1</sub> y ha sido caracterizada como un homodímero estable cuya interface dimérica es formada por interacciones entre los elementos de estructura secundaria requeridos para la formación del nudo en cada subunidad<sup>74</sup>. Esto permite determinar la presencia de un nudo en diversos sustratos diseñados en base a MJ0366 caracterizando la formación de dímeros

#### **5.1.2. *Estabilidad y topología de los sustratos anudados de MJ0366.***

Para convertir a la proteína anudada MJ0366 en un sustrato para ClpXP se adicionó a su extremo carboxilo terminal el péptido señal *ssrA* (secuencia:AANDENYALAA)<sup>51</sup> (Fig.8A). Además, para facilitar su purificación también se adicionó la secuencia del hexapéptido de histidina entre el péptido *ssrA* y extremo carboxilo terminal de MJ0366. Experimentos de cromatografía de exclusión molecular y curvas de estabilidad obtenidas en presencia de GdnHCl y seguidas por dicroísmo circular indican que la señal *ssrA* y los residuos de histidina no afectan la estabilidad (Fig.8B) ni el estado oligomérico (Fig.8C) de la proteína anudada. En el caso de otros sustratos multidominios utilizados en esta tesis, tal como GFP-MJ0366-*ssrA*, sus perfiles de elución obtenidos a 500 nm (absorbancia característica de GFP) también muestran una especie correspondiente al peso molecular de un dímero. La formación de un dímero en estos sustratos, se corroboró mediante intercambio de subunidades (esquema en Fig.S2, página 54). Al incubar GFP-MJ0366-*ssrA* con MJ0366-*ssrA* se observa la aparición de una nueva población de moléculas con un peso molecular menor al homodímero de GFP-MJ0366-*ssrA* y mayor al



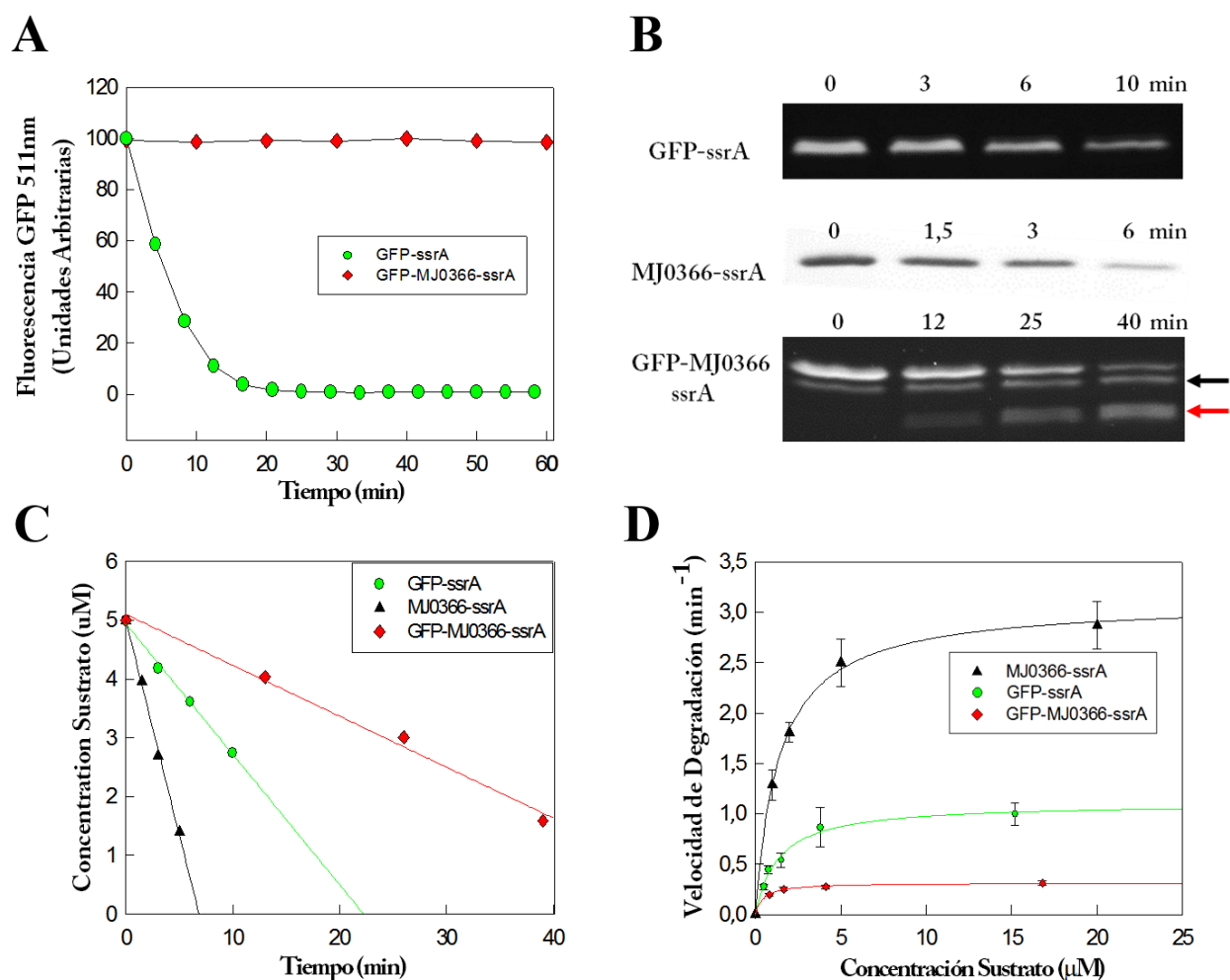
**Figura 8. Estabilidad y estado oligomérico de los sustratos anudados.** A) Esquemas de los sustratos diseñados para ClpXP. B) Curvas de estabilidad de MJ0366-WT y MJ0366-ssrA, obtenidas en función de cloruro de guanidinio. Los valores de estabilidad obtenidos:  $\Delta G^{H_2O} = 9 \pm 0,3$  y  $9 \pm 1$  kcal/mol para MJ0366-WT y MJ0366-ssrA, respectivamente, fueron determinados ajustando el cambio de la señal de dicroísmo circular a 220 nm a un modelo de dos estados. C) Perfil de elución de MJ0366-ssrA (— obtenida por absorbancia a 280nm; 24 kDa) y GFP-MJ0366-ssrA (— obtenida por absorbancia a 500 nm; 84 kDa) en cromatografía de exclusión molecular. Los perfiles de elución de los ensayos intercambio de subunidades entre GFP-MJ0366-ssrA y MJ0366-ssrA, se estudiaron con una cantidades equimolares de ambos sustratos (—) y con un exceso de MJ0366-ssrA (.....). En ambos casos las muestras fueron seguidas utilizando la absorbancia de GFP a 500 nm.

homodímero de MJ0366-ssrA lo que indica que ambas proteínas pueden formar dímeros con subunidades intercambiadas (Fig.8C). Estos resultados demuestran que los sustratos utilizados para ClpXP se encuentran plegados y anudados.

### 5.1.3. Degradación de los sustratos anudados por ClpXP.

Los distintos sustratos anudados fueron sometidos a ensayos de degradación por ClpXP según las condiciones descritas en metodología. Como control de las preparaciones de ClpXP se realizaron cinéticas de degradación utilizando la proteína fluorescente verde (GFP) con la secuencia señal ssrA en su extremo carboxilo terminal (GFP-ssrA). Las cinéticas de degradación del sustrato GFP-ssrA fueron seguidas en un espectrofluorímetro mediante la desaparición de

su fluorescencia a 511 nm (Fig.9A). Como se observa en la figura 9A la fluorescencia disminuye llegando a un plateau o meseta luego de 20 min. También las cinéticas de degradación de GFP-ssrA fueron seguidas mediante la fluorescencia en geles de SDS-PAGE (Fig.9B) (revisar sección 4.2.2. de metodología para mayor detalle). Como se muestra en la figura 9C, Las velocidades iniciales de degradación de GFP-ssrA fueron determinadas mediante la variación temporal de la intensidad de la banda fluorescente de GFP-ssrA en el segmento lineal inicial de la curva de progreso. Las velocidades iniciales a distintas concentraciones de GFP-ssrA fueron



**Figura 9. Cinéticas de degradación de MJ0366-ssrA, GFP-ssrA y GFP-MJ0366-ssrA.** **A)** Cinéticas de degradación de GFP-ssrA y GFP-MJ0366-ssrA seguidas por fluorescencia total de GFP a 511 nm (excitación 467 nm). **B)** Cinéticas de degradación de los sustratos (5  $\mu$ M) seguidas geles de SDS-PAGE. La degradación de MJ0366-ssrA es seguida por tinción Coomassie y fluorescencia en gel para GFP-ssrA y GFP-MJ0366-ssrA. Para GFP-MJ0366-ssrA se indica con una flecha roja el producto de degradación parcial, y con una flecha negra la banda secundaria del sustrato sin el péptido ssrA. **C)** Determinación de velocidad inicial de degradación de sustratos de ClpXP observadas mediante ensayos en gel. **D)** Cinéticas ajustadas al modelo de Michaelis-Menten utilizando diferentes concentraciones de sustrato (N = 3 para cada punto). Los parámetros cinéticos se muestran en Tabla 1.

ajustadas al modelo hiperbólico de Michaelis Menten (Fig.9D), obteniendo valores de  $K_M = 1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$  y  $k_{deg} = 1,1 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$  (Tabla 1). Dentro del error, los valores obtenidos son idénticos a los reportados en literatura ( $1,1 \mu\text{M}$  y  $1,4 \text{ min}^{-1}$ )<sup>54</sup> ( $1,5 \mu\text{M}$  y  $1,2 \text{ min}^{-1}$ )<sup>64</sup>.

Los ensayos de degradación de MJ0366-ssrA seguidos por el cambio en la intensidad de la banda de este sustrato por geles de SDS-PAGE, muestran que el sustrato anudado es fácilmente degradado por la maquinaria proteolítica (Fig.9B). En la figura 9B se observa que luego de 6 minutos ClpXP ha degradado prácticamente todo MJ0366-ssrA lo cual ocurre sin la aparición de productos parcialmente degradados (Fig.S3, página 54). Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para MJ0366-ssrA ( $K_M = 1,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$  y  $k_{deg} = 3,1 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ ), son similares a los parámetros cinéticos de sustratos fácilmente degradados por ClpXP<sup>53</sup>. Por lo tanto, el nudo en MJ0366-ssrA no presenta un impedimento al desplegamiento y degradación mediado por ClpXP.

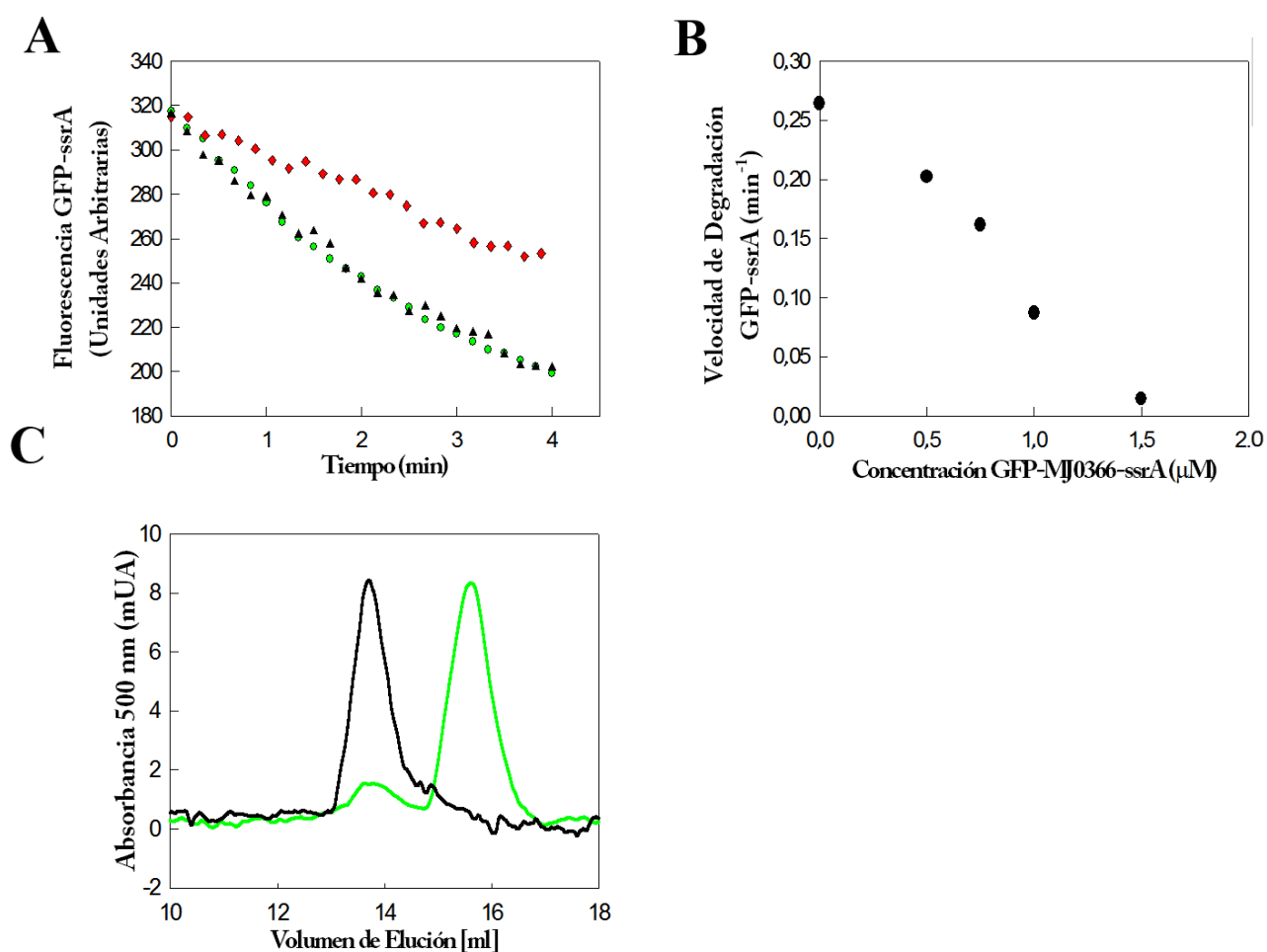
En coherencia con estos resultados, las dinámicas moleculares de translocación de MJ0366 han mostrado que el nudo de MJ0366 puede deslizarse y desanudarse por su extremo N terminal antes de que este se alcance a apretar<sup>10</sup>. Esto se debe a que el nudo de MJ0366 debe deslizarse sólo 17 aminoácidos para desatarse por su extremo N-Terminal. Para evitar que el nudo se desate durante el proceso de degradación de MJ0366, se diseñó un sustrato con el dominio de GFP su extremo N-terminal (GFP-MJ0366-ssrA). En este sustrato multidominio, el dominio plegado de GFP actúa como un tapón que restringe estéricamente la topología anudada de MJ0366 mientras ClpXP degrada MJ0366 desde su extremo C-terminal. De esta manera se pretende obligar a ClpXP a enfrentarse a un nudo apretado durante la translocación del dominio de MJ0366. Interesantemente, GFP-MJ0366-ssrA mostró una altísima resistencia a la degradación en los ensayos cinéticos seguidos por fluorescencia total a 511 nm, ya que luego de 1 hora de

**Tabla 1. Parámetros cinéticos**

Sustrato	$k_{deg}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>
GFP-ssrA	$1,1 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$
MJ0366-ssrA	$3,1 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$
GFP-MJ0366-ssrA	$0,31 \pm 0,01$	$0,5 \pm 0,05$

<sup>a</sup> Determinadas por el ajuste hiperbólico de la velocidades iniciales de degradación de la banda correspondiente al sustrato intacto v/s concentración de sustrato. N = 3 para cada concentración de sustrato. Se muestra el error asociado al ajuste hiperbólico.

degradación la fluorescencia es un 95% de la señal inicial (Fig.9A). Para descartar que esta resistencia a la degradación se deba a que ClpXP no reconoce a GFP-MJ0366-ssrA, se elaboró un ensayo de competencia (Fig.10A). Este ensayo consiste en comparar la velocidad de degradación de GFP-ssrA en presencia y ausencia del sustrato GFP-MJ0366-ssrA, si este último es reconocido por ClpXP este competirá con GFP-ssrA por el sitio activo de la proteasa, disminuyendo la velocidad de degradación observada para GFP-ssrA. Como se observa en la figura 10A la velocidad de degradación de GFP-ssrA disminuye en presencia del sustrato competidor GFP-MJ0366-ssrA y es dependiente de la concentración agregada de este (Fig. 10B).



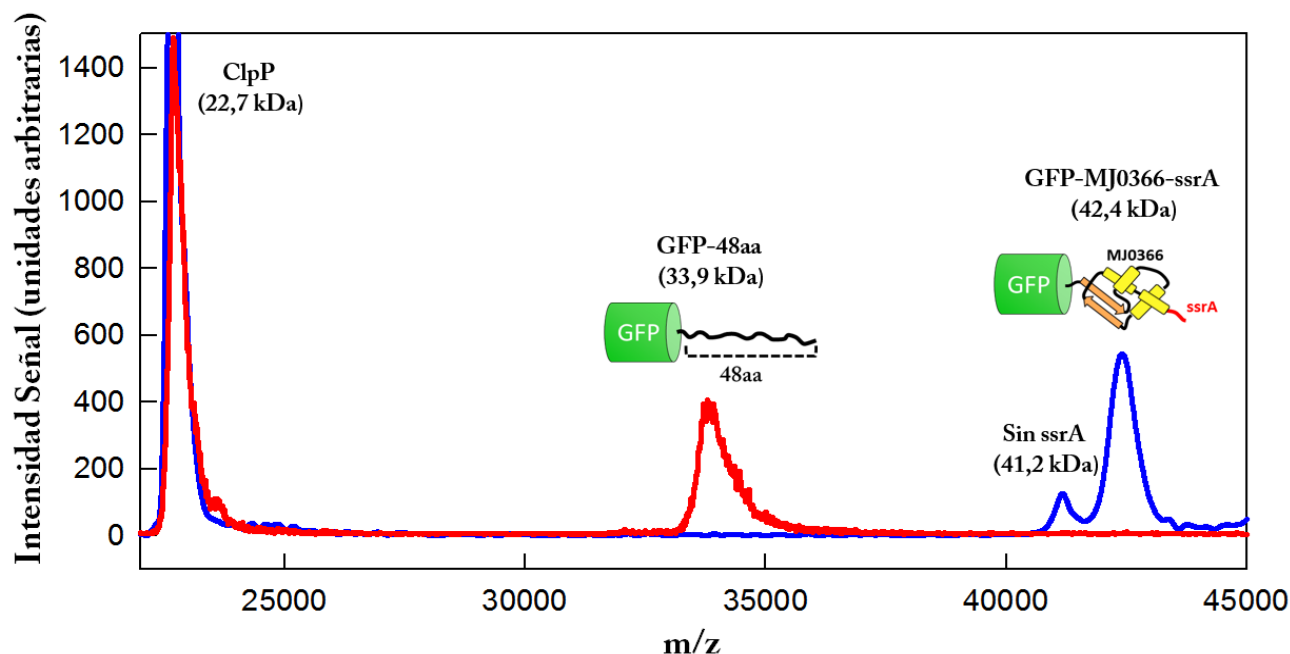
**Figura 10. GFP-MJ0366-ssrA es reconocido y degradado parcialmente por ClpXP.** **A)** Cinéticas de degradación de GFP-ssrA (●) obtenidas en presencia de GFP-MJ0366-ssrA (◆) y en presencia de una muestra proteolizada de GFP-MJ0366-ssrA sin péptido señal ssrA (▲) (digerida por la proteasa TEV). **B)** Velocidad de degradación de GFP-ssrA en función de la concentración del inhibidor GFP-MJ0366-ssrA. **C)** Cromatografía de exclusión molecular, seguida a 500 nm del ensayo de degradación de GFP-MJ0366-ssrA (—) y del control sin ClpXP (—). El área del producto parcialmente degradado corresponde al 95% del área del pico cromatográfico sustrato en el control no enzimático.

El efecto inhibitorio desaparece si el péptido señal *ssrA* de GFP-MJ0366-*ssrA* es eliminado por un corte proteolítico realizado por la proteasa TEV<sup>70</sup> (Fig.10A). El conjunto de estos resultados demuestra que ClpXP reconoce al sustrato multidominio GFP-MJ0366-*ssrA* a través de la señal *ssrA*, pero no puede degradarlo.

En las cinéticas de degradación de GFP-MJ0366-*ssrA* seguidas por fluorescencia en gel SDS-PAGE (Fig.9B), se aprecia que la desaparición de la banda fluorescente de mayor tamaño, correspondiente GFP-MJ0366-*ssrA*, ocurre concomitantemente con aparición de una banda fluorescente de menor peso molecular correspondiente a un producto de degradación parcial (Flecha roja, en Fig.9B). Como la desaparición de la banda fluorescente de GFP-MJ0366-*ssrA* y la aparición del producto parcialmente degradado ocurren sin un gran cambio en la fluorescencia total de GFP (Fig.9A), se deduce que la mayor parte del sustrato es convertido por ClpXP a un producto de degradación parcial que retiene el dominio intacto de GFP. En coherencia con lo anterior, cromatografías de exclusión molecular de los ensayos de degradación seguidos a 500 nm (Fig.10C) muestran que la población de un producto parcialmente degradado formado luego de 2 horas de degradación corresponde al 95% de la concentración de sustrato inicial. Por lo tanto, el hecho de que se mantenga la fluorescencia de GFP y que GFP-MJ0366-*ssrA* sea parcialmente degradado, indica que la detención del proceso de degradación ocurre luego del desplegamiento de MJ0366 y antes del desplegamiento de GFP.

Cabe destacar, que en los ensayos cinéticos en gel presentan una banda fluorescente de un tamaño levemente menor que GFP-MJ0366-*ssrA*. Esta banda se encuentra presente en preparaciones de sustrato no incubadas con ClpXP y su cantidad se mantiene intacta en presencia de ClpXP (Flecha negra en Fig.9B). Por lo tanto, esta banda puede corresponder a una población del sustrato que carece del péptido *ssrA*. Para comprobarlo, las preparaciones de sustratos fueron tratadas con proteasa TEV para eliminar específicamente el péptido *ssrA* del extremo carboxilo terminal de GFP-MJ0366-*ssrA*. Como se observa en la figura S4 (página 55) el tratamiento con TEV convierte las dos bandas del sustrato en una sola banda fluorescente de menor peso molecular. En caso de que la banda no degradable fuera una especie con el extremo N-terminal del sustrato proteolizado, el tratamiento con TEV generaría dos bandas, ambas con menores pesos moleculares que las intactas. En coherencia, en los espectros de masa de GFP-MJ0366-*ssrA* se observa una especie con la masa teórica del sustrato multidominio sin el péptido *ssrA* (10 residuos menos que GFP-MJ0366-*ssrA*) (Fig.11).





**Figura 11. Tamaño del producto de degradación parcial de GFP-MJ0366-ssrA.** Espectros de masa, obtenidos por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF), del ensayo de degradación de GFP-MJ0366-ssrA a tiempo 0 (—) y a 120 minutos de degradación (—). Luego de la degradación se observa la aparición de una nueva especie con un peso molecular de 33,9 kDa, que corresponde a GFP más 48 aminoácidos (GFP-48aa). A tiempo 0 se observan dos poblaciones de GFP-MJ0366-ssrA, una a un peso molecular 1,2 kDa menor que coincide con el peso teórico de GFP-MJ0366 sin la señal ssrA.

Los parámetros cinéticos de la degradación parcial de GFP-MJ0366-ssrA fueron determinados a partir de la velocidad de desaparición de la banda correspondiente al sustrato intacto (Fig.9B, 9C y 9D). GFP-MJ0366-ssrA presentó una  $K_M$  de  $0,5 \pm 0,1$   $\mu\text{M}$  y una  $k_{\text{deg}}$  de  $0,31 \pm 0,01$   $\text{min}^{-1}$  similar a sustratos resistentes a la degradación por ClpXP<sup>53</sup>. Cabe destacar que la  $k_{\text{deg}}$  de GFP-MJ0366-ssrA es en realidad una constante de degradación aparente, determinada por la frecuencia con la que ClpXP degrada parte del dominio de MJ0366 y la frecuencia con la cual ClpXP libera el producto parcialmente degradado. La disminución en un orden de magnitud de la  $k_{\text{deg}}$  con respecto a MJ0366-ssrA es un claro indicativo que el mecanismo de degradación del dominio de MJ0366 cambia en gran medida si su nudo está restringido estéricamente por GFP, y sugiere que ClpXP presenta una gran dificultad para procesar el sustrato multidominio.

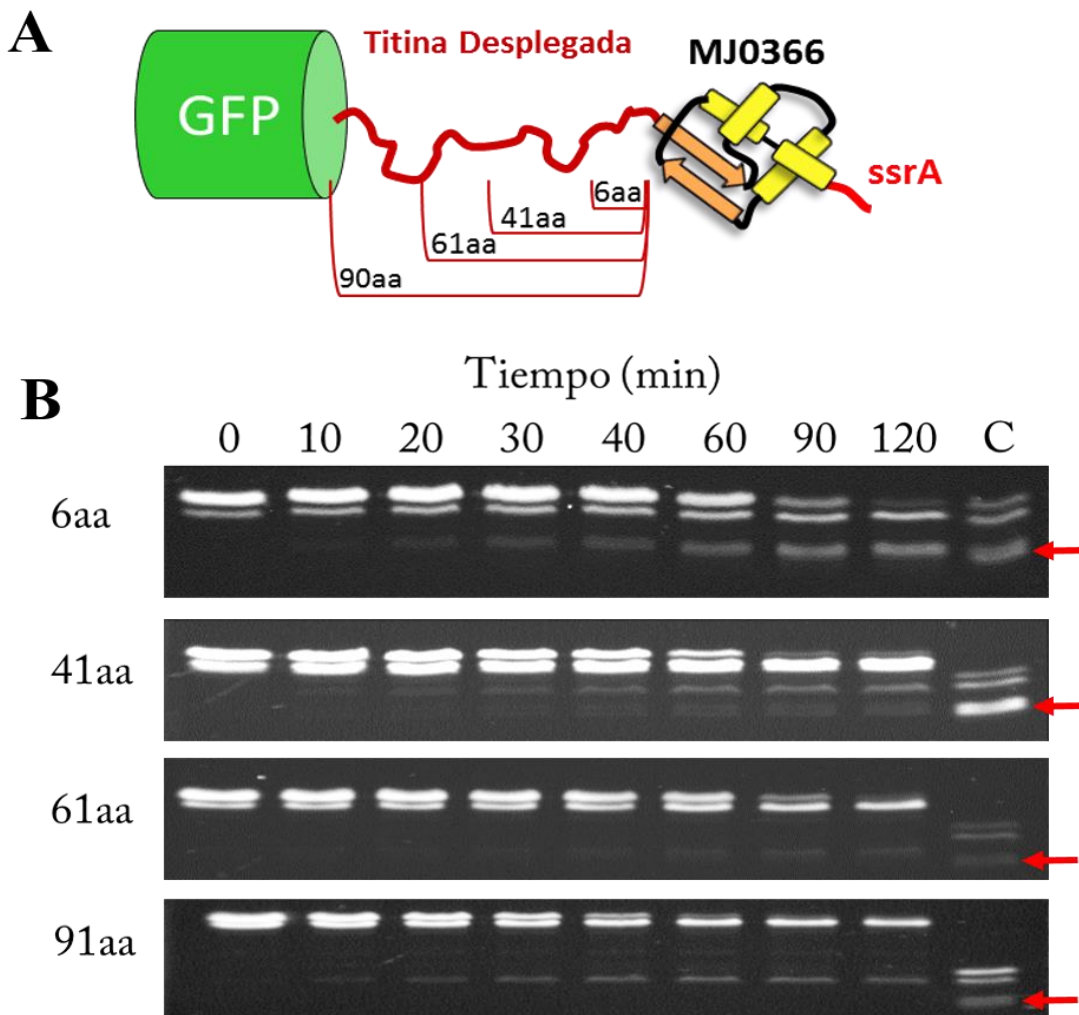
ClpXP libera sustratos muy difíciles de desplegar, evitando un gasto excesivo de ATP<sup>55,59</sup>. Sustratos multidominio formados por un dominio normalmente degradable por ClpXP y un segundo dominio resistente, han mostrado que ClpXP al fallar repetidos intentos de desplegamiento del segundo dominio, eventualmente se separa del sustrato generando un producto de degradación parcial<sup>55,59</sup>. Estos resultados son similares a los descritos para

GFP-MJ0366-ssrA, pero la radical diferencia es que el segundo dominio (GFP) es normalmente degradado por ClpXP. De hecho en sustratos multidominio formados por GFP y el dominio I27 de titina (GFP-Titina-ssrA), GFP es degradada<sup>54</sup>. La única manera de observar productos de degradación parcial de GFP-Titina-ssrA es a muy bajas concentraciones de ATP o en presencia de ATP $\gamma$ S<sup>54</sup>, mientras que en los ensayos aquí realizados MJ0366 protege casi completamente a GFP en condiciones saturantes de ATP. El tamaño de los productos de degradación parcial, de los sustratos multidominio descritos en literatura, corresponde al segundo dominio intacto más una “cola” (tail) de 36-38 residuos<sup>54,59</sup>. Esto se debe a que una cadena extendida de 36 residuos cubre la distancia necesaria para llegar desde la entrada del poro de ClpX al sitio activo más cercano de ClpP<sup>54,55,59</sup>. Notablemente, la masa determinada por MALDI-TOF del producto parcialmente degradado de GFP-MJ0366-ssrA es de  $33,9 \pm 0,7$  kDa, lo que corresponde al dominio de GFP más  $48 \pm 6$  residuos (GFP-48aa) (Fig.11). Estos extra 10-12 residuos pueden ser razonablemente explicados por la formación de un nudo incompresible entre GFP y el poro de ClpXP. Estudios de pinzas ópticas y dinámicas moleculares de estiramiento de proteínas anudadas indican que un nudo incompresible está formado por 12-13 aminoácidos<sup>8,10,25</sup>. Por lo tanto, estos resultados sugieren que a medida que ClpXP transloca MJ0366 el nudo se aprieta contra GFP, lo que previene su desplegamiento y lleva a ClpXP a liberar un producto parcialmente degradado (Esquema en Fig.13A, página 34).

#### 5.1.4. *Sustratos anudados multidominio con espaciadores de titina.*

Para determinar si el nudo por si solo puede detener la degradación mediada por ClpXP o si requiere que el nudo se apriete contra un dominio plegado, es necesario aumentar la distancia entre GFP y MJ0366. Esto se debe a que la poca distancia que hay entre el nudo de MJ0366 y GFP (17 residuos) hace poco probable que el nudo se apriete antes de deslizarse hasta GFP y por lo tanto que ClpXP se enfrente solo a un nudo apretado<sup>10</sup>. Además aumentando la distancia entre los dominios podremos determinar si ClpXP es capaz de translocar el nudo por su poro, lo que no es claro aún, ya que la degradación de MJ0366-ssrA se puede deber a que el nudo se desata por el extremo N-terminal de MJ0366. Para aumentar la distancia se agregaron polipéptidos desplegados de distintos tamaños entre ambos dominios (Fig.12A). Los polipéptidos desplegados se obtuvieron de una doble mutación del dominio I27 de titina (C47E C63E) cuya estructura ha sido reportada desplegada en ausencia de agentes caotrópicos<sup>75</sup>. Si el nudo es capaz de detener a ClpXP, se deberían observar diversos productos de degradación

parcial de mayor peso que GFP-48aa, y si es que el nudo es translocado por ClpXP se debería observar una menor protección de GFP. En los ensayos de degradación de los sustratos multidominio con espaciadores de 6, 41, 61 y 90 residuos, seguidos por fluorescencia en SDS-PAGE (Fig.12B) y cromatografía de exclusión molecular (Fig.S5, página 55), se observó una clara disminución de la protección de GFP a medida que aumentamos el tamaño del espaciador (Tabla 2). Esto es un claro indicador de que el nudo por sí solo no puede detener la degradación y que ClpXP puede translocarlo en algún punto del espaciador. Por otra parte, al aumentar el



**Figura 12. La protección de GFP es dependiente de su distancia con MJ0366.** **A)** Esquema de los cuatro sustratos con distintos largos de espaciador de titina entre GFP y MJ0366. Espaciador de 6 aminoácidos (GFP-Titina<sup>6</sup>-MJ0366-ssrA), 41 aminoácidos (GFP-Titina<sup>41</sup>-MJ0366-ssrA), 61 aminoácidos (GFP-Titina<sup>61</sup>-MJ0366-ssrA) y los 90 aminoácidos del dominio I27 completo (GFP-Titina<sup>90</sup>-MJ0366-ssrA). **B)** Ensayos de degradación seguidos por fluorescencia en gel de SDS-PAGE. Los sustratos con espaciadores de 6 y 41 aminoácidos muestran la formación de un producto parcialmente degradado que migra con el mismo tamaño que el producto parcialmente degradado GFP-48aa (flecha roja) obtenido luego de 2 horas de degradación de GFP-MJ0366-ssrA (C). Con largos de espaciador de 41 aminoácidos o mayores, se observa un segundo producto de degradación parcial de mayor peso molecular que GFP-48aa.

tamaño de los sustratos la velocidad de degradación aumentó lo que indica que los nudos no impactan negativamente la velocidad de translocación de ClpXP.

Al analizar el tamaño de los productos de degradación parcial y compararlos con GFP-48aa (Flecha roja, Fig.12B), se observó que los sustratos con espaciadores de 41, 61 y 90 generan productos de degradación parcial de mayor tamaño que GFP-48aa, pero su concentración determinada por absorbancia cromatografía de exclusión molecular es sólo de un ~15% de la concentración inicial de sustrato (Tabla 2 y Fig.S5, página 55). Sólo los sustratos con espaciadores de 6 y de 41 residuos generan un producto de similar tamaño a GFP-48aa. La formación del producto GFP-48aa durante la degradación del sustrato con un espaciador de 41 residuos implica que la formación de este producto no es dependiente de la secuencia primaria de MJ0366. Cabe destacar que todos los sustratos analizados están anudados, ya que mantienen la capacidad de formar dímeros y realizar intercambio de subunidades con MJ0366-ssrA (Tabla 2 y Fig.S6, página 56).

En base a los resultados obtenidos con GFP-MJ0366-ssrA y sus variantes con el espaciador de titina es posible plantear un modelo mínimo con dos posibles y excluyentes eventos durante la degradación de sustratos multidominios anudados (Fig.13). El sustrato puede ser degradado de manera incompleta si el nudo de MJ0366 se desliza y aprieta contra GFP (Fig.13A) o completamente si el nudo se aprieta antes de alcanzar GFP (Fig.13B). A medida que se incrementa el tamaño del espaciador, aumenta la probabilidad de que el nudo se apriete antes de llegar a GFP y sea translocado a través del poro de ClpXP. Esta situación se propone debido a la menor formación de productos parcialmente degradados al aumentar el largo del

**Tabla 2. Caracterización sustratos anudados para ClpXP.**

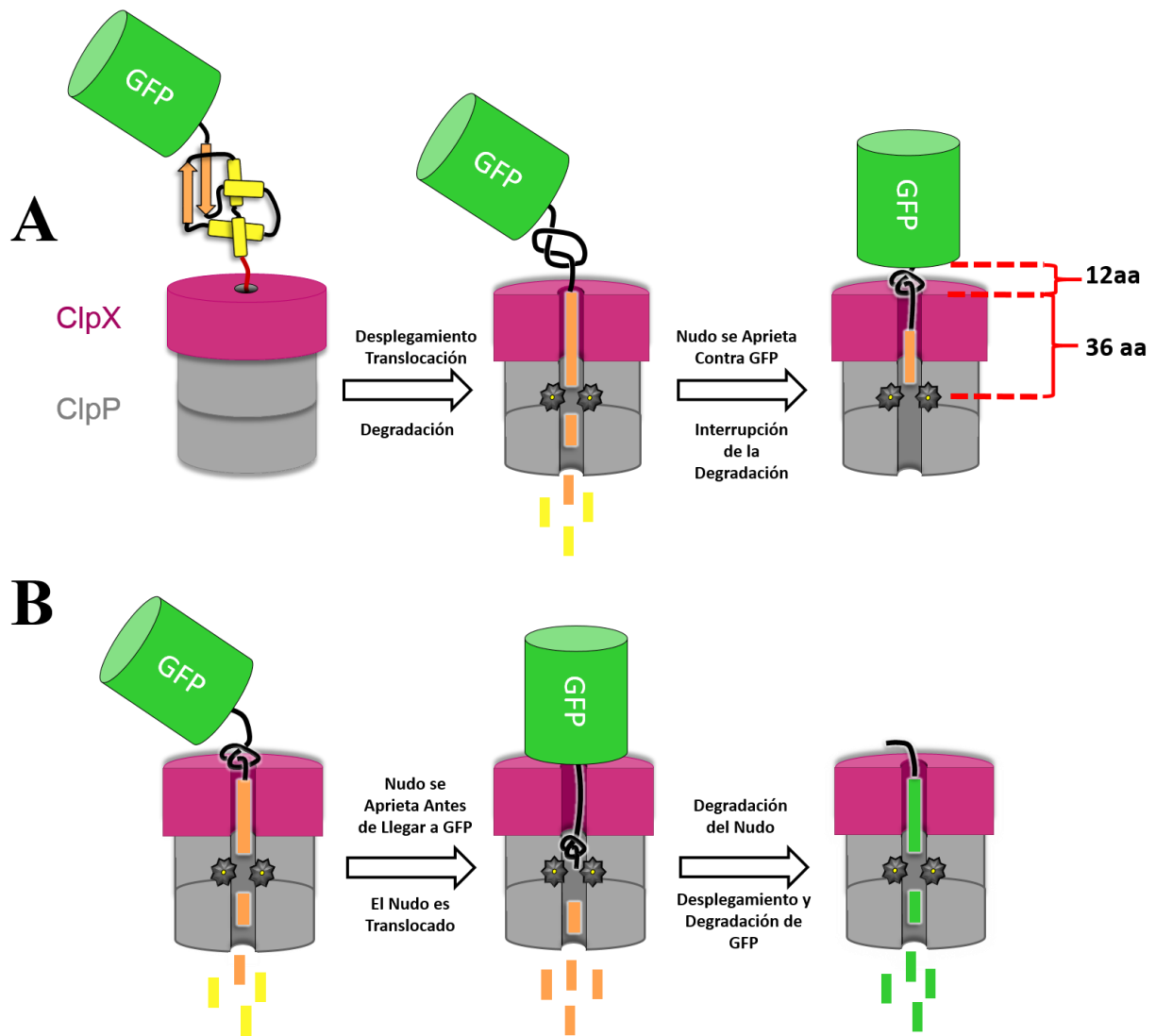
Sustrato	Peso Molecular S.E.C. (kDa) <sup>a</sup>	Peso molecular Dímero teórico (kDa)	$k_{deg}$ (min <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	% Degradación Parcial <sup>c</sup>
MJ0366-ssrA	24	28	3,1	0
GFP-MJ0366-ssrA	84	85	0,31	95
GFP-Titina <sup>6</sup> -MJ0366-ssrA	81	87	0,63	85
GFP-Titina <sup>41</sup> -MJ0366-ssrA	95	94	0,96	15
GFP-Titina <sup>61</sup> -MJ0366-ssrA	101	99	0,75	18
GFP-Titina <sup>90</sup> -MJ0366-ssrA	121	107	1,09	12

<sup>a</sup> Pesos moleculares estimados a partir del radio de giro correspondiente al volumen de elución en cromatografía de exclusión molecular.

<sup>b</sup> Aproximación de la  $k_{deg}$  determinada a partir de la velocidad de inicial de degradación en condiciones saturantes de sustrato (20  $\mu$ M). La velocidad inicial fue determinada por la desaparición de la banda correspondiente al sustrato intacto en SDS-PAGE. (N = 1)

<sup>c</sup> Determinado por el porcentaje del área del pico cromatográfico del producto parcialmente degradado con respecto al área del pico cromatográfico del sustrato en el control no enzimático (Fig.S5).

espaciador. La translocación de un nudo colapsado o comprimido tiene sentido debido a que se ha demostrado que el poro de ClpXP no es rígido y puede expandirse para translocar dos cadenas polipeptídicas<sup>58</sup>. Por otra parte, el hecho de que el nudo proteja de la degradación a GFP al apretarse contra ella es un claro indicativo de que en conjunto generan una barrera prácticamente infranqueable para ClpXP.



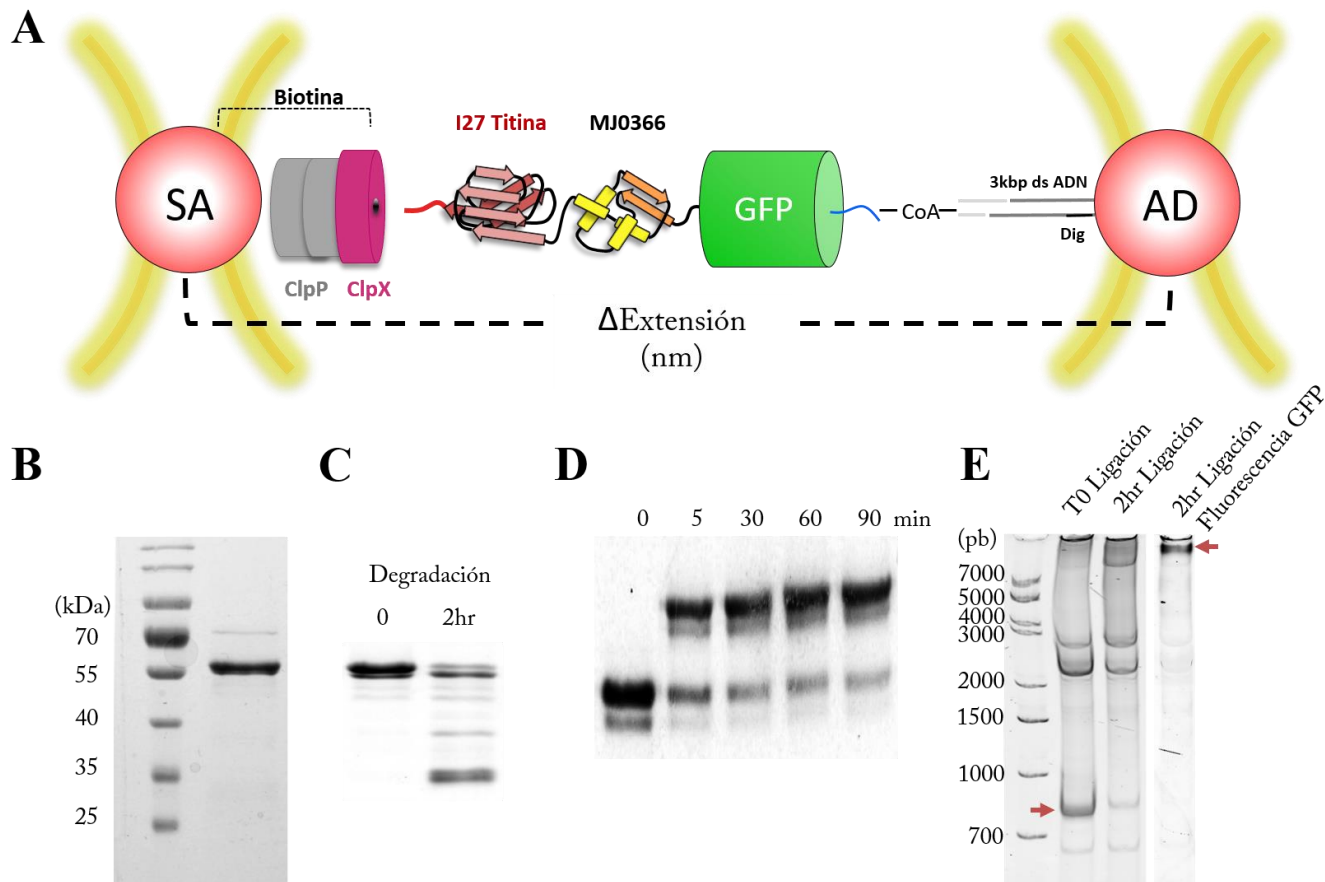
**Figura 13. Modelo para degradación de sustratos anudados multidominio por ClpXP.** ClpXP al enfrentarse con un sustrato anudado multidominio puede generar dos resultados cuya probabilidad de ocurrencia depende de la distancia entre el nudo y GFP. **A)** El nudo puede ser apretado contra GFP lo que provoca que ClpXP sea incapaz de continuar con la degradación. Eventualmente, ClpXP libera un producto de degradación parcial compuesto por el GFP más 48 aminoácidos: 12aa que forman el nudo apretado y 36aa correspondientes al largo requerido para llegar al sitio catalítico de ClpP. **B)** Si el nudo se aprieta lejos de un dominio plegado, ClpXP puede translocarlo y continuar con la degradación de GFP.

## 5.2. *Objetivo específico 2.*

### 5.2.1. *Degradación de proteínas con topologías anudadas en pinzas ópticas.*

Los experimentos cinéticos realizados en el objetivo específico 1 no permiten estudiar las velocidades de desplegamiento y translocación de manera independiente. Estudiar separadamente los eventos de desplegamiento y translocación de MJ0366 es fundamental para comprender como el nudo disminuye la velocidad de degradación GFP-MJ0366-ssrA. En ausencia de esta información mecanística no es posible descartar explicaciones triviales, no relacionadas con un nudo, tales como que MJ0366 se estabilice mecánicamente al fusionarse con GFP.

Es por ello que llevamos estos ensayos de degradación a pinzas ópticas de alta resolución, en donde es posible observar de manera directa y a tiempo real cómo ClpXP degrada sus sustratos<sup>60</sup>. Como se muestra en la figura 14A la geometría de este ensayo requiere de la unión de ClpXP y su sustrato a esferas de poliestireno las cuales pueden ser atrapadas por trampas ópticas creadas por un láser (revisar sección 4.2.3 de metodología para mayor detalle). Al acercar las esferas, ClpXP puede reconocer al sustrato y dar inicio a la reacción, la cual es seguida por el cambio en la distancia entre ambas esferas en el tiempo. Los eventos de desplegamiento se observan como un incremento abrupto de la distancia en las esferas y los eventos de translocación como una disminución paulatina de la distancia, ya que la translocación por ClpXP va acortando el polipéptido que ahora conecta ambas esferas<sup>60</sup> (Fig.6B). El sustrato diseñado para los ensayos en pinzas ópticas posee un dominio I27 de titina en el carboxilo terminal (Fig. 7B y 14A). Este dominio se agregó para generar una ventana temporal de 1 a 2 segundos requerida para que el equipo pueda detectar la formación de complejo ClpXP-sustrato y coleccionar los datos de distancia entre las esferas. De esta forma, como ClpXP debe degradar primero el dominio I27 de titina, podremos registrar los eventos de desplegamiento y translocación de MJ0366. El dominio de titina además sirve como control, ya que permite comparar dentro de la misma molécula la translocación de un dominio con y sin nudo. El sustrato fue purificado (Fig.14B), y modificado (Fig.14D y 14E) para unirse a las esferas de poliestireno. Ensayos de intercambio de subunidades (Tabla S1 y Fig.S7, página 57) y de degradación seguidos por fluorescencia en SDS-PAGE (Fig.14C), muestran que el sustrato GFP-MJ0366-Titina-ssrA forma dímeros y una gran cantidad de producto de degradación parcial, de manera



**Figura 14. Diseño y ensamblado del sistema de degradación en pinzas ópticas.** **A)** Geometría del ensayo de degradación de pinzas ópticas de doble trampa. ClpX<sub>6</sub> biotilada se une a una esfera recubierta de streptavidina (SA), mientras que el sustrato GFP-MJ0366- Titina-ssrA se une indirectamente a una esfera recubierta con anticuerpos anti-digoxigenina a través de un fragmento de ADN de 3 kb. **B)** Gel de SDS-PAGE de la Purificación del sustrato GFP-MJ0366-Titina-ssrA **C)** Degradación de GFP-MJ0366-Titina-ssrA por ClpXP, seguido por fluorescencia en gel. **D)** Modificación covalente del sustrato con un oligo de doble hebra de ADN, observándose un cambio de peso molecular seguido por fluorescencia en gel. **E)** Ligación del complejo sustrato-oligo a un fragmento de ADN de 3 kb modificado con digoxigenina. Para controlar la eficiencia de ligación, se digirió la ligación con HindIII. Esto genera un fragmento de 740pb con el extremo que se une al sustrato. En una electroforesis TBE-PAGE teñida con GelRed observamos cómo la banda de 740 pb desaparece luego de la ligación y la aparición de especies de altos pesos moleculares que colocalizan con la fluorescencia de GFP a 511nm.

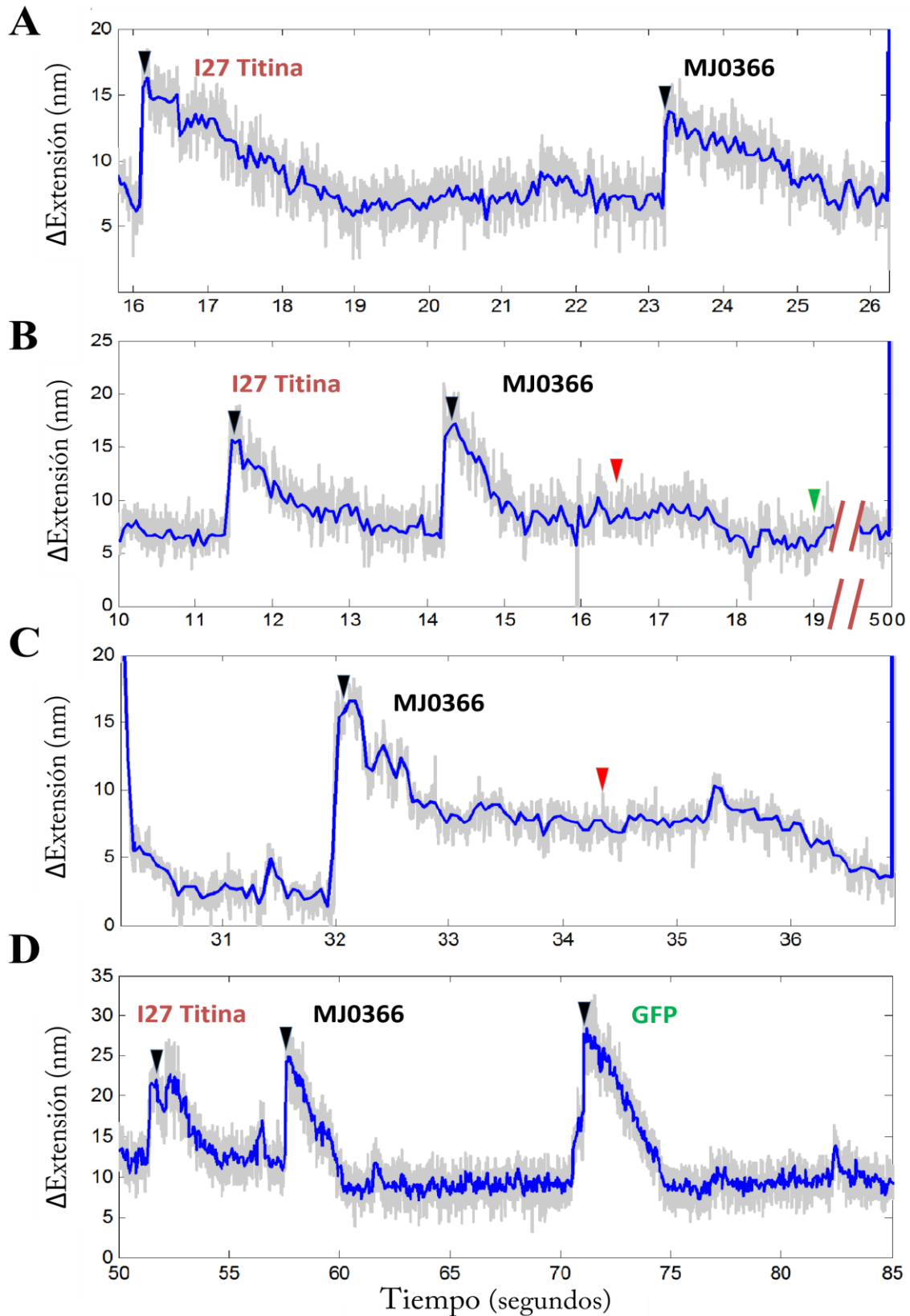
muy similar a GFP-MJ0366-ssrA. Todo esto es indicativo de que la adición de la Titina no afecta el estado topológico anudado de MJ0366, ni su resistencia a la degradación por ClpXP.

Durante la estancia en Berkeley se logró montar este ensayo y observar cómo ClpXP degrada GFP-MJ0366-Titina-ssrA, sin embargo, la baja cantidad de trayectorias obtenidas (20 en total), solo permiten analizar de manera cualitativa estos resultados. En la figura 15 se muestran trayectorias de degradación representativas de los distintos comportamientos de ClpXP durante la degradación del sustrato multidominio anudado. En la figura 15A, se observa primero el desplegamiento de la Titina y su translocación, y luego el desplegamiento de la proteína anudada MJ0366. Sin embargo, durante la translocación de MJ0366 ClpXP se separa

del sustrato, lo que se refleja en la abrupta pérdida de tensión y el gran aumento en la extensión. También se observaron pausas durante la translocación de la proteína anudada seguida de una translocación a menor velocidad (Fig.15B y 15C). Se observaron pausas anormalmente largas una vez que MJ0366 ha sido translocada, es decir cuando la translocación disminuye la extensión a un valor similar al que tenía antes del desplegamiento de MJ0366 (Fig.15B). Por último, se pudo observar un caso poco común (sólo una vez), en donde se observa la degradación de los tres dominios incluyendo a GFP (Fig.15D). Este último ensayo es de suma importancia debido a que corrobora que el sistema está completo y todas sus proteínas plegadas. Interesantemente, en esta trayectoria la extensión translocada de MJ0366 es mayor al cambio en la extensión de su desplegamiento, difiriendo de las demás trayectorias en donde la extensión de translocación es igual o menor a la desplegamiento. Esto se podría deber a que en este caso ClpXP puede translocar además el nudo compacto de MJ0366.

Las pausas previas al desplegamiento de MJ0366 fueron bastante cortas (de 2 a 4 segundos), este tiempo refleja la cantidad de intentos que requiere ClpXP para desplegar MJ0366 y se relaciona de manera directa con la facilidad de ClpXP para desplegar sustratos (la constante de desplegamiento ( $k_{des}$ ))<sup>60</sup>. Los tiempos de espera para el desplegamiento de MJ0366 son menores respecto a lo reportado para proteínas no anudadas<sup>60</sup>, lo que indica que el nudo *per se* no es un factor que confiera una resistencia al desplegamiento mecánico mediado por ClpXP. Por otra parte, una vez desplegada la estructura de MJ0366 su velocidad de translocación no se afecta significativamente, debido a que su velocidad de translocación libre de pausas es similar a la de la titina y GFP (compare las pendientes de translocación en la figura 15). Durante la translocación de MJ0366 se observaron algunas pausas de 3 a 4 segundos las cuales son de similar duración a las reportadas durante la translocación de otras proteínas (Fig.6, página 14)<sup>60</sup>. Sin embargo, se observaron pausas largas cuando MJ0366 ya ha sido translocada y ClpXP intenta desplegar GFP, en estos casos la proteasa puede detenerse por más de 5 minutos (Fig.15B). Estos tiempos de espera para desplegar GFP son completamente inusuales, ya que ClpXP despliega GFP en  $9 \pm 1,4$  segundos en ausencia de un nudo<sup>60</sup>. Estos resultados permiten afirmar que la baja  $k_{deg}$  de GFP-MJ0366-ssrA observada en los experimentos *in multiplo* o en solución, se debe a una disminución de la velocidad de desplegamiento de GFP y no porque MJ0366 se estabilice mecánicamente ni porque el que el nudo disminuya la velocidad de translocación.





**Figura 15. Trayectorias de degradación del sustrato multidominio para pinzas ópticas.** Trayectorias de degradación representativas, en donde se pueden observar eventos de desplegamiento (▼), translocación, pausas durante la translocación (▼) y pausas largas luego de translocar MJ0366 (▼). Los datos crudos de extensión vs tiempo fueron filtrados y reducidos a 1000Hz (—) y a 2,5Hz (—). La fuerza durante las trayectorias osciló entre A) 6,75-7,25 pN, B) 6,5-7,0 pN, C) 8,7-9,5 pN, D) 4,75-5,5 pN.

## **6. DISCUSIÓN**

Diferentes autores han propuesto que las proteínas con topologías anudadas son sustratos difíciles de desplegar mecánicamente por proteasas dependientes de ATP<sup>2,43</sup>. En contraste, nuestros experimentos muestran que una proteína anudada tipo 3<sub>1</sub> MJ0366 es fácilmente desplegada por ClpXP. Además, reportamos que ClpXP es capaz de translocar a través de su poro el nudo 3<sub>1</sub> de MJ0366. Sin embargo, el nudo 3<sub>1</sub> no es completamente silente, ya que puede detener completamente el proceso de degradación si se aprieta contra un dominio plegado en sustratos multidominio.

### ***6.1. Mecanismo de protección de GFP por el nudo.***

El modelo propuesto en la figura 13A, en donde el nudo protege a GFP al apretarse contra esta, se basa en la observación de un producto de degradación parcial correspondiente a GFP-48aa. Sin embargo, los espectros de las masas obtenidos por MALD-TOF presentan una distribución ancha con un máximo correspondiente al peso de la especie GFP-48aa (Fig.11). Las masas comienzan en un valor de m/z correspondiente a GFP-42aa y termina en GFP-54aa. De esta manera el tamaño del producto parcialmente degradado es en realidad GFP-48aa ± 6 residuos. Esta variabilidad puede ser originada por diferentes grados de compactación del nudo, que parte del nudo ingrese al poro de ClpXP o que ClpP genere cortes proteolíticos en sitios distintos. Alternativamente, el ancho de la distribución de la señal puede ser explicado por una limitación instrumental.

Se intentó mejorar las señales disminuyendo las concentraciones de sales, de ATP y del amortiguador mediante diálisis, columnas de desalting, de exclusión molecular y precipitación de proteínas con ácido tricloroacético, pero no observamos mejoras sustanciales en la distribución de masas. También, se intentó concentrar las muestras en Amicon Ultra-Centrifugal Filter Units, pero GFP-48aa se adhiere a los filtros. Alternativamente, los productos de degradación fueron extraídos de los geles SDS-PAGE por electro-elución o por difusión de las proteínas a solución, pero no se obtuvieron señales.

El tamaño de GFP-48aa permite inferir la presencia de un nudo apretado contra GFP, pero no explica el mecanismo por el cual el nudo estabiliza a GFP. A diferencia de otros sustratos de ClpXP, GFP es desplegada en dos pasos con una estructura intermediaria<sup>54,60</sup>. Primero ClpXP separa la hebra beta 11 del extremo C-terminal de GFP formando una estructura intermediaria, luego debe translocar rápidamente este segmento desplegado para desestabilizar la estructura intermediaria y prevenir el replegamiento de GFP<sup>54</sup>. En este escenario, la presencia de un nudo apretado puede impedir la degradación de GFP evitando la extracción de la hebra beta 11 y/o favoreciendo su replegamiento. Una posibilidad es que el nudo actúe como un resorte, absorbiendo parte de la fuerza aplicada por ClpXP, o que el nudo dificulte la entrega efectiva de trabajo a GFP al deformar/expandir del poro de ClpXP disminuyendo su sujeción o *grip* al sustrato. En ambos casos, la fuerza neta aplicada a GFP quedaría bajo el umbral mecánico requerido para separar y desplegar la hebra beta 11 del extremo C-terminal de GFP. Alternativamente, como el desplegamiento de GFP requiere también sobrepasar una barrera cinética, el abultamiento de la cadena polipeptídica, generado por el nudo, podría disminuir la frecuencia con la cual ClpXP transloca la hebra beta 11 por debajo la frecuencia de replegamiento de GFP. Esta última alternativa puede ser descartada debido a que no se observaron eventos de replegamiento de GFP en las trayectorias de degradación en pinzas ópticas. Por el contrario, las trayectorias obtenidas por pinzas ópticas como las de la figura 15A y 15C muestran que ClpXP se separa del sustrato durante el proceso de translocación, lo cual no ha sido observado en trayectorias de degradación de proteínas de similar tamaño como los de filamina (100 residuos)<sup>62</sup>. Esto indica que el nudo protege a GFP mediante disminución de la entrega efectiva de trabajo debido por la pérdida de sujeción de ClpXP por el sustrato.

El estado dimérico de los sustratos anudados multidominio fue utilizado para determinar la presencia de nudos en su estructura pero no se evaluó directamente si la presencia de un dímero es un factor que debe ser tomado en cuenta en su mecanismo de degradación. Ensayos de degradación de otros sustratos diméricos, han mostrado que cuando ClpXP se enfrenta a un dímero formado por un monómero que posee la señal *ssrA* y otro que no, ClpXP es incapaz de degradar al monómero sin la señal<sup>58</sup>. Otros estudios con sustratos diméricos con ambos monómeros con la señal *ssrA*, han mostrado que ClpXP no degrada de manera conjunta los monómeros, sino que degrada un monómero y libera al otro a la solución<sup>76</sup>. Esto ocurre aun cuando las señales *ssrA* de los monómeros se localizan muy cerca entre sí<sup>76</sup>. Estos antecedentes

indican que el monómero que es reconocido y degradado por ClpXP no arrastra al otro monómero a la cavidad proteolítica de ClpXP. Acorde con estos antecedentes, en los ensayos de degradación de proteínas multidominio anudados, la banda fluorescente de los monómeros sin la señal *ssrA* se mantiene constante (Fig.9B y 12B). Como los monómeros sin la señal *ssrA* pueden formar dímeros con un monómero con la señal *ssrA*, el hecho de que no sean degradados (Fig.9B y 12B) demuestra que ClpXP no degrada conjuntamente los monómeros de los sustratos utilizados. Por lo tanto, el estado dimérico de los sustratos anudados no es un factor que afecte su mecanismo de degradación ni explique la protección de GFP reportada en esta tesis.

La formación de dímeros a través de MJ0366 afecta el grado de pureza y homogeneidad de las preparaciones de los sustratos multidominio, lo cual también puede afectar los parámetros cinéticos reportados en esta tesis. Los cromatogramas de exclusión molecular de las preparaciones de los sustratos multidominio, presentan un hombro cuyo peso molecular es menor al esperado respecto a los sustratos diméricos y retiene la absorbancia de GFP a 500 nm (Fig.S6, página 56). Al coleccionar las fracciones correspondientes a los hombros y cargarlas en un gel SDS-PAGE se aprecia una banda cuyo peso molecular corresponde al esperado para el sustrato multidominio y una banda adicional correspondiente al tamaño de MJ0366-*ssrA* (Fig.S8, página 57). Esto indica que las especies que forman los hombros son heterodímeros constituidos por monómeros de los sustratos multidominio unidos a monómeros de MJ0366-*ssrA*. En coherencia, los experimentos de intercambio de subunidades muestran que el hombro presenta un volumen de elución idéntico al heterodímero formado por el intercambio de subunidades (Fig.S6). Es probable que dentro de la célula los sustratos multidominio sufran un corte proteolítico que separe GFP de MJ0366-*ssrA* y como MJ0366-*ssrA* retiene la capacidad de formar dímeros, puede formar dímeros con un monómero intacto del sustrato multidominio dando origen al hombro. Debido a que esta contaminación posee la señal de degradación *ssrA* su presencia puede actuar como un sustrato competitivo en los ensayos de degradación. Sin embargo, y a pesar de ello, la interpretación y análisis comparativo de las  $k_{deg}$  entre los diferentes sustratos multidominios no es afectada debido a que la contaminación de MJ0366-*ssrA* es similar entre todas las muestras con un 15 a un 27% de monómeros de MJ0366-*ssrA* (Tabla S2, página 58). Además, una contaminación de un 20% no puede explicar la diferencia de un orden de magnitud entre la  $k_{deg}$  de MJ0366-*ssrA* y la de GFP-MJ0366-*ssrA*.

## 6.2. *Tensión en los ensayos de degradación realizados en pinzas ópticas.*

Para desplegar a sus sustratos en la célula ClpXP aplica fuerza únicamente en uno de los extremos del sustrato. Sin embargo, la geometría utilizada en los ensayos de pinzas ópticas aplica fuerzas en ambos extremos del sustrato. Esto se debe a que el sustrato es sometido a una fuerza aplicada por ClpXP sobre su extremo C-terminal y también sometido a una fuerza aplicada en dirección opuesta por la esfera de poliestireno unida a su extremo N-terminal. Esta geometría puede afectar tanto el comportamiento del sustrato como el de ClpXP. Por ejemplo, si la fuerza aplicada al sistema es muy alta es posible que las proteínas se desplieguen espontáneamente por la tensión generada por las trampas ópticas y no por la actividad de ClpXP. Debido a que ClpXP degrada a los sustratos multidominio de manera secuencial, solo puede desplegar al dominio con el que se encuentra en contacto directo. Esto permite fácilmente diferenciar los eventos de desplegamiento independientes de ClpXP, ya que estos no son seguidos por una etapa de translocación. Para reducir estos eventos de desplegamiento independiente se mantuvieron los ensayos en un rango de fuerzas de 5 a 10 pN, en donde ya ha sido reportado que sustratos con dominios de GFP pueden mantenerse en tensión por varios minutos sin desplegarse<sup>60</sup>. Similarmente, ensayos de degradación en pinzas ópticas de sustratos con dominios I27 de titina han mostrado que solo un 5% de los eventos de desplegamiento observados son independientes de ClpXP<sup>77</sup>. Para el caso de MJ0366, en nuestro laboratorio se han realizado experimentos de estiramiento a fuerza constante en pinzas ópticas, en donde el dominio de MJ0366 se despliega con una constante de  $0,0086 \text{ s}^{-1}$  a 10 pN, es decir que en promedio se despliega luego de 120 segundos. De manera que la probabilidad de que los dominios del sustrato GFP-MJ0366-Titina-ssrA se desplieguen de manera independiente durante las trayectorias de degradación es baja. Sin embargo, en el caso de las proteínas anudadas la tensión puede generar artefactos adicionales que complejizan la comparación de las trayectorias *in singulo* con los resultados obtenidos *in multiplo* o en solución.

La tensión puede alterar en gran medida la dinámica de apretamiento de los nudos, ya que al desplegarse una proteína anudada en pinzas ópticas, su cadena polipeptídica es rápidamente estirada compactando al nudo<sup>8,43,56,57</sup>. De esta manera, el proceso de translocación en pinzas ópticas puede comenzar con un nudo de menor tamaño que en los ensayos en solución.

En consecuencia, la tensión debería aumentar la probabilidad de que el nudo se apriete antes de llegar a GFP y que ClpXP pueda translocarlo y degradar GFP. Sin embargo, en pinzas ópticas no se observó un enriquecimiento de estos eventos en comparación a los ensayos en solución de GFP-MJ0366-ssrA. La tensión afecta también el comportamiento de un nudo luego de apretarse. En dinámicas de translocación de proteínas se ha observado que bajo fuerza constante un nudo apretado tiende a inmovilizarse<sup>78,79</sup>, sobre todo cuando es tensado con fuerza en direcciones opuestas<sup>79</sup>. Por el contrario, al aplicar fuerza de manera periódica (ciclos de fuerza constante interrumpidos por pausas sin fuerza) el nudo puede expandirse cuando se le deja de aplicar fuerza, permitiéndole moverse en el próximo periodo de fuerza<sup>78</sup>. En los ensayos en solución, ClpXP degrada sus sustratos aplicando fuerza de manera periódica en un ciclo acoplado a la hidrólisis de ATP. Debido a la presencia de una constante fuerza de tensión en los ensayos de pinzas ópticas, no es posible observar los efectos de la aplicación de fuerza periódica durante translocación de polipéptidos anudados.

Otra consecuencia de la tensión sobre el sistema es el incremento de la probabilidad de separación de ClpXP del sustrato. A diferencia de los ensayos en solución, en pinzas ópticas ClpXP degrada a sus sustratos en presencia de una fuerza de oposición. Por ello, si ClpXP pierde por un instante sujeción por el sustrato, la fuerza de oposición extraerá el sustrato del poro de ClpXP separándolos. Esto fue observado en la mayoría de las trayectorias obtenidas, que como se muestra en la figura 15A y 15C, ClpXP se separa mientras transloca el dominio anudado de MJ0366. En estas trayectorias ClpXP despliega, transloca y se separa de MJ0366 en solo 8 segundos (Fig.15A) y 7 segundos (Fig.15C). Estos tiempos no tienen coherencia con el valor de la constante de degradación de GFP-MJ0366-ssrA ( $0,31 \text{ min}^{-1}$ ), en donde en promedio ClpXP se tarda alrededor de 3 minutos en degradar parcialmente al dominio de MJ0366 de este sustrato multidominio. Estos resultados sugieren que en pinzas ópticas la fuerza de oposición, asociada a la pérdida de sujeción por la presencia de un nudo, aumenta la frecuencia con la que ClpXP se separa los sustratos en comparación con los ensayos en solución.

### 6.3. *Interpretación de las cinéticas de degradación de los sustratos multidominio con espaciadores de titina.*

Además de determinar el efecto estabilizante del nudo sobre GFP, también exploramos la habilidad de ClpXP de translocar o deslizar el nudo 3<sub>1</sub> de MJ0366, utilizando distintos largos de espaciadores de titina. El aumento de la distancia entre GFP y MJ0366 aumenta la probabilidad de que el nudo se apriete durante la translocación, ya que como se ha observado en dinámicas de translocación, los nudos se aprietan con mayor frecuencia cuando estos se encuentra a mayor distancia de los extremos terminales de la proteína (nudos de mayor profundidad)<sup>9,10</sup>. Al aumentar el largo de los espaciadores, se observó que la formación de productos de degradación parcial disminuye notablemente. Estos resultados muestran que la probabilidad de que un nudo apretado por si solo detenga a ClpXP es baja, debido a que la desaparición de la banda correspondiente GFP-48aa no es compensada por la formación de productos de degradación parcial de mayor tamaño. Además indican que ClpXP no desliza los nudos suavemente hasta GFP, ya que a medida que aumentamos la distancia del espaciador por sobre 41 residuos no observamos formación del producto de degradación parcial GFP-48aa. Más bien, estos resultados pueden ser explicados por un modelo en donde ClpXP es capaz de translocar un nudo apretado si este se forma durante la translocación de los espaciadores de titina, permitiendo a ClpXP continuar con la degradación de GFP. Por lo que la protección de GFP depende casi de manera exclusiva del apretado del nudo contra ella.

La probabilidad de que ClpXP transloque al nudo o que lo apriete contra GFP, no solo afecta el grado de protección de GFP sino también la velocidad de degradación de los sustratos multidominio. A diferencia de lo planteado en la hipótesis, el nudo 3<sub>1</sub> de MJ0366 no disminuye en gran medida la velocidad de translocación, ya que los ensayos al aumentar el largo del espaciador de titina la velocidad de degradación de los sustratos anudados aumenta (Tabla 2). Los sustratos con espaciadores más cortos, que son los que forman una mayor cantidad de GFP-48aa, tienen una menor constante de degradación ( $k_{deg}$ ). Esto sugiere que el apretado del nudo contra GFP seguido de la liberación de GFP-48aa por ClpXP es un proceso especialmente lento. Interesantemente, nuestros resultados en pinzas ópticas muestran que las pausas más largas ocurren cuando MJ0366 ya ha sido translocada y ClpXP intenta desplegar GFP (Fig.15B), que es precisamente cuando se forma el producto parcialmente degradado GFP-48aa. Una forma de comprender esto es que al apretarse el nudo contra GFP (Fig.13A), ClpXP intenta muchas veces

desplegarla antes de liberar el producto parcialmente degradado, haciéndolo un proceso lento. Por ello, es plausible que el incremento de la  $k_{deg}$  observado al aumentar la distancia entre GFP y MJ0366 incremente la probabilidad de translocar el nudo y seguir una vía alternativa más rápida descrita por el modelo de la figura 13B.

La protección variable de GFP observada como función del largo de los separadores de titina puede compararse con resultados de dinámicas moleculares de nudos apretados en polímeros. A nivel molecular, se han descrito dos comportamientos: nudos difusivos y no-difusivos. Los nudos difusivos han sido observados en polímeros homogéneos como el ADN<sup>80,81</sup>, en donde al formarse un nudo apretado las fluctuaciones térmicas le permiten difundir o deslizarse suavemente a través de la cadena polimérica. Por el contrario, los nudos apretados en polímeros no homogéneos como las proteínas presentan un comportamiento no-difusivo<sup>8-10</sup>. El comportamiento no difusivo se debe a las distintas propiedades y tamaños de las cadenas laterales, y a las distintas geometrías locales a lo largo de la cadena polipeptídica que estabilizan en distinto grado a los nudos. Por ejemplo, segmentos de la cadena polipeptídica con residuos de prolina tienden a inmovilizar los nudos debido a los quiebres que generan en la cadena polipeptídica<sup>9,10</sup>, o segmentos con cadenas no polares generan interacciones dentro del nudo que lo estabilizan. Por lo tanto, en las dinámicas de translocación de proteínas anudadas los nudos no se deslizan suavemente sino que tienden a apretarse e inmovilizarse en ciertos segmentos de la cadena polipeptídica<sup>9,10</sup>. Nuestros resultados son la primera evidencia experimental que apoya al comportamiento no difusivo de los nudos en proteínas, ya que al aumentar la distancia entre GFP y MJ0366, ClpXP transloca el nudo en vez de deslizarlo hasta GFP.

Debido al comportamiento no-difusivo es posible que los nudos obstruyan la translocación mediada por proteasas dependientes de ATP, si es que estas presentan poros de menor diámetro que ClpXP o si degradan sustratos con nudos de mayor complejidad. Recientemente, se estiró en pinzas ópticas un nudo complejo tipo  $5_2$  presente en la proteína UCHL1 (homólogo de la ubiquitina hidrolasa humana) cuyo estado compacto abarca 40 residuos con un diámetro de 45 Å<sup>43</sup>, mucho mayor a los 16 Å del nudo apretado  $3_1$  de MJ0366. Por lo tanto, este nudo  $5_2$  podría obstruir hasta el poro expandido de ClpXP que es de ~20 Å de diámetro.



#### 6.4. *Relación entre la interferencia de los nudos en procesos de degradación y su baja representación en la naturaleza.*

Durante las últimas décadas ha habido un amplio debate sobre porqué existen tan pocas proteínas anudadas, inicialmente se propuso que el anudado de la cadena polipeptídica sugeriría una gran complicación para el eficiente plegamiento de las proteínas<sup>28-30</sup>, especialmente en proteínas con nudos profundos<sup>82</sup>. Sin embargo, a pesar de que el paso limitante en el plegamiento de estas proteínas es la formación del nudo<sup>29,30,34,35</sup>, las proteínas anudadas se pliegan eficientemente y en escalas de tiempo similares a las proteínas sin nudos<sup>35,37</sup>. Acorde con esto, la proteína anudada MJ0366 se pliega correctamente incluso cuando se le agregan 200 residuos en el extremo N-terminal y 100 en el extremo C-terminal, como es el caso del sustrato GFP-MJ0366-Titina-ssrA. Por lo tanto, desde el punto de vista del plegamiento, los sustratos multidominio anudados utilizados en esta tesis sugieren que el plegamiento de las proteínas anudadas no es un proceso tan difícil como para explicar por si solo la selección negativa de estas. Esta tesis apoya una explicación alternativa, presentando la primera evidencia experimental de que las topologías anudadas afectan un proceso biológico vital para las células, como es el reciclaje controlado de proteínas. Por lo tanto, las secuencias de proteínas anudadas no solo han sido seleccionadas por su habilidad de formar estructuras únicas, sino que además por su habilidad de ser degradadas.

## **7. PROYECCIONES**

Los resultados de este trabajo conforman las bases para continuar con la investigación de la translocación de proteínas anudadas, utilizando ClpXP así como también otros sistemas que requieren translocar proteínas por poros estrechos. Es posible modificar los sustratos utilizados en este trabajo con las señales de reconocimiento para el poro mitocondrial, sistemas de secreción y otras proteasas dependientes de ATP como el proteasoma y ClpAP. Esto permitiría tener una visión clara del comportamiento de las topologías anudadas durante la translocación. Actualmente se están alterando los sustratos anudados multidominio para ser importados a la mitocondria, esto permitirá no solo probar un nuevo sistema sino que realizar ensayos de translocación *in vivo*.

Con respecto a los estudios con ClpXP, estamos generando sustratos multidominio con espaciadores de titina de largos de 10, 20 y 30 residuos. Esto permitirá determinar con mayor resolución la relación entre la probabilidad de que se apriete el nudo de MJ0366 con la distancia que debe deslizarse. Además, si encontramos un sustrato que, en igual o similar proporción se transloque el nudo y se deslice contra GFP, permitiría comparar con mayor facilidad mecanismo de estos eventos en pinzas ópticas. Por otra parte, la degradación por ClpXP de un sustrato con un nudo de mayor complejidad es uno de los experimentos más evidentes a realizar. La ubiquitina hidrolasa UCHL1 con un nudo  $5_2$  es un potencial candidato.

## **8. CONCLUSIONES**

- -El nudo  $3_1$  de la proteína MJ0366 no otorga especial resistencia al desplegamiento mecánico mediado por ClpXP.
- El nudo  $3_1$  no disminuye significativamente la velocidad de translocación de ClpXP.
- -El nudo  $3_1$  es capaz de detener la degradación mediada por ClpXP al apretarse contra un dominio plegado como el de GFP, disminuyendo la sujeción por el sustrato y forzando a la proteasa a liberar un producto parcialmente degradado con el dominio intacto de GFP más 48 aminoácidos.
- -Los nudos  $3_1$  tienen un comportamiento no difusivo y pueden ser translocados por ClpXP si estos se aprietan lejos de un dominio plegado.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

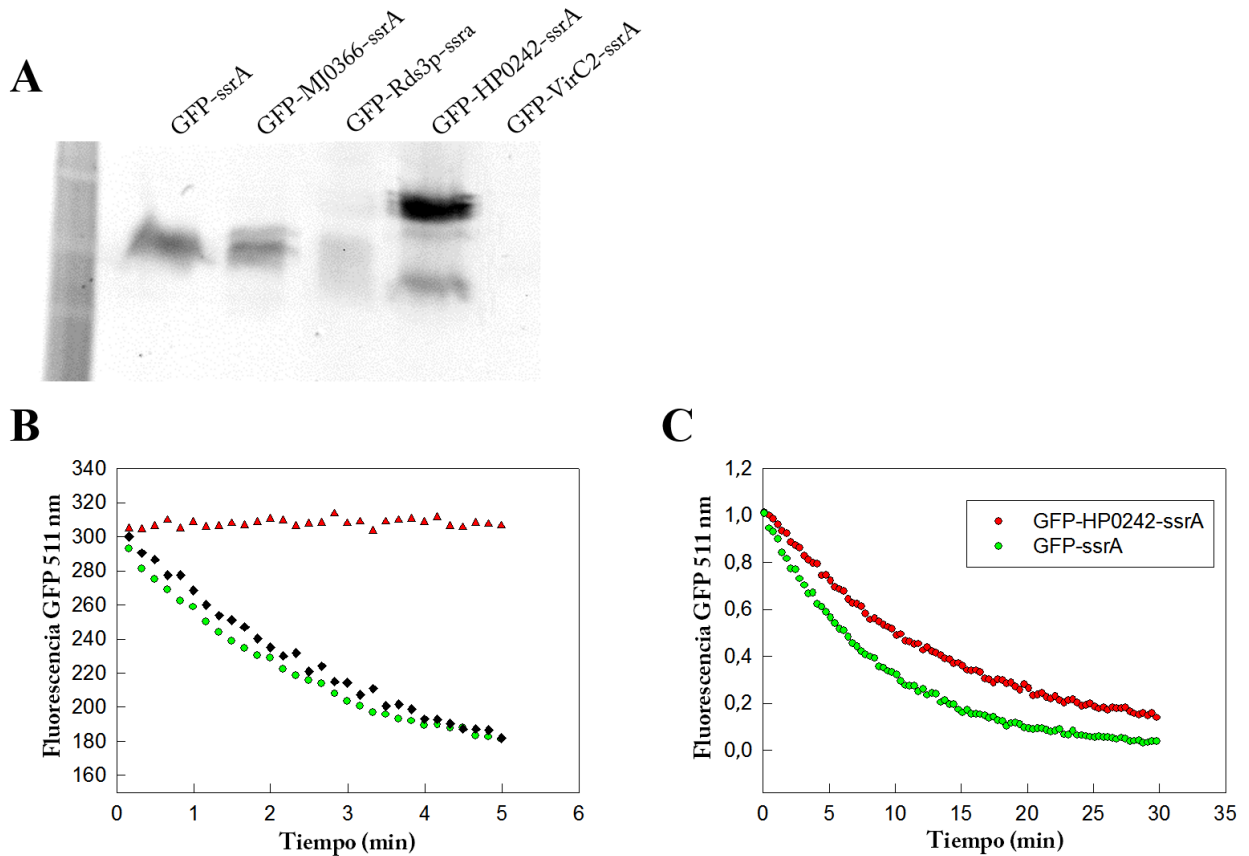
1. W. R. Taylor, A deeply knotted protein structure and how it might fold. *Nature* 406, 916-919 (2000).
2. P. Virnau, L. A. Mirny, M. Kardar, Intricate knots in proteins: Function and evolution. *PLoS computational biology* 2, e122 (2006).
3. W. R. Taylor, Protein knots and fold complexity: some new twists. *Computational biology and chemistry* 31, 151-162 (2007).
4. M. L. Mansfield, Are there knots in proteins? *Nature structural & molecular biology* 1, 213-214 (1994).
5. M. Jamroz, W. Niemyska, E. J. Rawdon, A. Stasiak, K. C. Millett, P. Sulkowski, J. I. Sulkowska, KnotProt: a database of proteins with knots and slipknots. *Nucleic acids research* 43, D306-314 (2015).
6. Y. L. Lai, S. C. Yen, S. H. Yu, J. K. Hwang, pKNOT: the protein KNOT web server. *Nucleic acids research* 35, W420-424 (2007).
7. W. R. Taylor, K. Lin, Protein knots: A tangled problem. *Nature* 421, 25 (2003).
8. J. Dzubiella, Sequence-specific size, structure, and stability of tight protein knots. *Biophysical journal* 96, 831-839 (2009).
9. P. Szymczak, Tight knots in proteins: can they block the mitochondrial pores? *Biochemical Society transactions* 41, 620-624 (2013).
10. P. Szymczak, Translocation of knotted proteins through a pore. *The European Physical Journal Special Topics* 223, 1805-1812 (2014).
11. H. M. Berman, T. N. Bhat, P. E. Bourne, Z. Feng, G. Gilliland, H. Weissig, J. Westbrook, The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nature structural biology* 7, 957-959 (2000).
12. J. I. Sulkowska, E. J. Rawdon, K. C. Millett, J. N. Onuchic, A. Stasiak, Conservation of complex knotting and slipknotting patterns in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E1715-1723 (2012).
13. W. B. R. Lickorish, *An introduction to knot theory* (Springer NY, New York, 1997).
14. G. M. Crippen, Topology of globular proteins. *Journal of theoretical biology* 45, 327-338 (1974).
15. K. C. Millett, E. J. Rawdon, A. Stasiak, J. I. Sulkowska, Identifying knots in proteins. *Biochemical Society transactions* 41, 533-537 (2013).
16. D. Bolinger, J. I. Sulkowska, H. P. Hsu, L. A. Mirny, M. Kardar, J. N. Onuchic, P. Virnau, A Stevedore's protein knot. *PLoS computational biology* 6, e1000731 (2010).
17. A. L. Mallam, How does a knotted protein fold? *The FEBS journal* 276, 365-375 (2009).
18. O. Nureki, M. Shirouzu, K. Hashimoto, R. Ishitani, T. Terada, M. Tamakoshi, An enzyme with a deep trefoil knot for the active-site architecture. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 58, 1129-1137 (2002).
19. K. Lim, H. Zhang, A. Tempczyk, W. Krajewski, N. Bonander, J. Toedt, A. Howard, E. Eisenstein, O. Herzberg, Structure of the YibK methyltransferase from *Haemophilus influenzae* (HI0766): a cofactor bound at a site formed by a knot. *Proteins* 51, 56-67 (2003).
20. J. R. Wagner, J. S. Brunzelle, K. T. Forest, R. D. Vierstra, A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* 438, 325-331 (2005).
21. T. C. Sayre, T. M. Lee, N. P. King, T. O. Yeates, Protein stabilization in a highly knotted protein polymer. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 24, 627-630 (2011).
22. T. Wang, H. Arakawa, A. Ikai, Reversible stretching of a monomeric unit in a dimeric bovine carbonic anhydrase B with the atomic force microscope. *Ultramicroscopy* 91, 253-259 (2002).
23. J. I. Sulkowska, P. Sulkowski, P. Szymczak, M. Cieplak, Stabilizing effect of knots on proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 19714-19719 (2008).

24. C. He, G. Z. Genchev, H. Lu, H. Li, Mechanically untying a protein slipknot: multiple pathways revealed by force spectroscopy and steered molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society* 134, 10428-10435 (2012).
25. C. He, G. Lamour, A. Xiao, J. Gsponer, H. Li, Mechanically tightening a protein slipknot into a trefoil knot. *Journal of the American Chemical Society* 136, 11946-11955 (2014).
26. Rhonald Lua, Alexander L. Borovinskiy, , Alexander Yu. Grosberg., Fractal and statistical properties of large compact polymers: a computational study. *Polymer* 45, 717-731 (2004).
27. G. A. Lua RC, Statistics of Knots, Geometry of Conformations, and Evolution of Proteins. *PLoS computational biology* 2, e1003075 (2006).
28. S. Wallin, K. B. Zeldovich, E. I. Shakhnovich, The folding mechanics of a knotted protein. *Journal of molecular biology* 368, 884-893 (2007).
29. J. I. Sulkowska, P. Sulkowski, J. Onuchic, Dodging the crisis of folding proteins with knots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3119-3124 (2009).
30. M. C. Prentiss, D. J. Wales, P. G. Wolynes, The energy landscape, folding pathways and the kinetics of a knotted protein. *PLoS computational biology* 6, e1000835 (2010).
31. E. A. Shank, C. Cecconi, J. W. Dill, S. Marqusee, C. Bustamante, The folding cooperativity of a protein is controlled by its chain topology. *Nature* 465, 637-640 (2010).
32. D. Baker, A surprising simplicity to protein folding. *Nature* 405, 39-42 (2000).
33. S. a Beccara, T. Skrbic, R. Covino, C. Micheletti, P. Faccioli, Folding pathways of a knotted protein with a realistic atomistic force field. *PLoS computational biology* 9, e1003002 (2013).
34. J. K. Noel, J. I. Sulkowska, J. N. Onuchic, Slipknotting upon native-like loop formation in a trefoil knot protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15403-15408 (2010).
35. A. L. Mallam, S. E. Jackson, Knot formation in newly translated proteins is spontaneous and accelerated by chaperonins. *Nature chemical biology* 8, 147-153 (2012).
36. D. N. Ivankov, A. V. Finkelstein, Prediction of protein folding rates from the amino acid sequence-predicted secondary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8942-8944 (2004).
37. N. P. King, A. W. Jacobitz, M. R. Sawaya, L. Goldschmidt, T. O. Yeates, Structure and folding of a designed knotted protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 20732-20737 (2010).
38. A. L. Mallam, J. M. Rogers, S. E. Jackson, Experimental detection of knotted conformations in denatured proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 8189-8194 (2010).
39. B. T. Andrews, D. T. Capraro, J. I. Sulkowska, J. N. Onuchic, P. A. Jennings, Hysteresis as a Marker for Complex, Overlapping Landscapes in Proteins. *The journal of physical chemistry letters* 4, 180-188 (2013).
40. C. Plesa, N. van Loo, P. Ketterer, H. Dietz, C. Dekker, Velocity of DNA during translocation through a solid-state nanopore. *Nano letters* 15, 732-737 (2015).
41. A. Rosa, M. Di Ventura, C. Micheletti, Topological jamming of spontaneously knotted polyelectrolyte chains driven through a nanopore. *Physical review letters* 109, 118301 (2012).
42. D. Marenduzzo, C. Micheletti, E. Orlandini, W. Summers de, Topological friction strongly affects viral DNA ejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 20081-20086 (2013).
43. F. Ziegler, N. C. Lim, S. S. Mandal, B. Pelz, W. P. Ng, M. Schlierf, S. E. Jackson, M. Rief, Knotting and unknotting of a protein in single molecule experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 7533-7538 (2016).
44. D. Panja, G. T. Barkema, A. B. Kolomeisky, Through the eye of the needle: recent advances in understanding biopolymer translocation. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* 25, 413101 (2013).

45. D. A. Dougan, *Subcellular Biochemistry* (Springer Netherlands, Dordrecht, 2013)
46. S. Gottesman, Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annual review of cell and developmental biology* 19, 565-587 (2003).
47. R. T. Sauer, T. A. Baker, AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annual review of biochemistry* 80, 587-612 (2011).
48. T. A. Baker, R. T. Sauer, ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 15-28 (2012).
49. S. A. Joshi, G. L. Hersch, T. A. Baker, R. T. Sauer, Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. *Nature structural & molecular biology* 11, 404-411 (2004).
50. S. Gottesman, E. Roche, Y. Zhou, R. T. Sauer, The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes & development* 12, 1338-1347 (1998).
51. C. M. Farrell, A. D. Grossman, R. T. Sauer, Cytoplasmic degradation of ssrA-tagged proteins. *Molecular microbiology* 57, 1750-1761 (2005).
52. D. Y. Kim, K. K. Kim, Crystal structure of ClpX molecular chaperone from *Helicobacter pylori*. *The Journal of biological chemistry* 278, 50664-50670 (2003).
53. J. A. Kenniston, T. A. Baker, J. M. Fernandez, R. T. Sauer, Linkage between ATP consumption and mechanical unfolding during the protein processing reactions of an AAA+ degradation machine. *Cell* 114, 511-520 (2003).
54. A. Martin, T. A. Baker, R. T. Sauer, Protein unfolding by a AAA+ protease is dependent on ATP-hydrolysis rates and substrate energy landscapes. *Nature structural & molecular biology* 15, 139-145 (2008).
55. C. Lee, M. P. Schwartz, S. Prakash, M. Iwakura, A. Matouschek, ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Molecular cell* 7, 627-637 (2001).
56. J. I. Sulkowska, P. Sulkowski, P. Szymczak, M. Cieplak, Tightening of knots in proteins. *Physical review letters* 100, 058106 (2008).
57. T. Bornschlogl, D. M. Anstrom, E. Mey, J. Dzubiella, M. Rief, K. T. Forest, Tightening the knot in phytochrome by single-molecule atomic force microscopy. *Biophysical journal* 96, 1508-1514 (2009).
58. R. E. Burton, S. M. Siddiqui, Y. I. Kim, T. A. Baker, R. T. Sauer, Effects of protein stability and structure on substrate processing by the ClpXP unfolding and degradation machine. *The EMBO journal* 20, 3092-3100 (2001).
59. J. A. Kenniston, T. A. Baker, R. T. Sauer, Partitioning between unfolding and release of native domains during ClpXP degradation determines substrate selectivity and partial processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1390-1395 (2005).
60. R. A. Maillard, G. Chistol, M. Sen, M. Righini, J. Tan, C. M. Kaiser, C. Hodges, A. Martin, C. Bustamante, ClpX(P) generates mechanical force to unfold and translocate its protein substrates. *Cell* 145, 459-469 (2011).
61. Y. Shin, J. H. Davis, R. R. Brau, A. Martin, J. A. Kenniston, T. A. Baker, R. T. Sauer, M. J. Lang, Single-molecule denaturation and degradation of proteins by the AAA+ ClpXP protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 19340-19345 (2009).
62. M. E. Aubin-Tam, A. O. Olivares, R. T. Sauer, T. A. Baker, M. J. Lang, Single-molecule protein unfolding and translocation by an ATP-fueled proteolytic machine. *Cell* 145, 257-267 (2011).
63. T. A. Nieminen, G. Knoner, N. R. Heckenberg, H. Rubinsztein-Dunlop, Physics of optical tweezers. *Methods in cell biology* 82, 207-236 (2007).

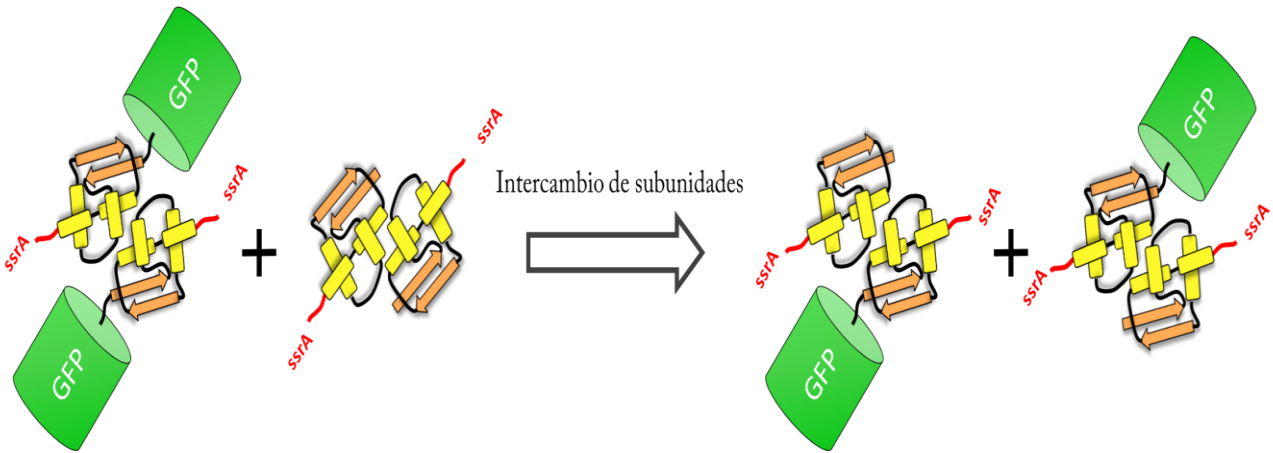
64. J. M. Flynn, I. Levchenko, M. Seidel, S. H. Wickner, R. T. Sauer, T. A. Baker, Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10584-10589 (2001).
65. Y. I. Kim, R. E. Burton, B. M. Burton, R. T. Sauer, T. A. Baker, Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Molecular cell* 5, 639-648 (2000).
66. A. Martin, T. A. Baker, R. T. Sauer, Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature* 437, 1115-1120 (2005).
67. A. Martin, T. A. Baker, R. T. Sauer, Distinct static and dynamic interactions control ATPase-peptidase communication in a AAA+ protease. *Molecular cell* 27, 41-52 (2007).
68. D. Drew, S. Newstead, Y. Sonoda, H. Kim, G. von Heijne, S. Iwata, GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature protocols* 3, 784-798 (2008).
69. V. S. Skosyrev, G. V. Vasil'eva, M. G. Lomaeva, L. V. Malakhova, V. N. Antipova, V. G. Bezlepkin, Specialized software product for comparative analysis of multicomponent DNA fingerprints. *Genetika* 49, 531-537 (2013).
70. D. A. Polayes, T. D. Parks, S. A. Johnston, W. G. Dougherty, Application of TEV Protease in Protein Production. *Methods in molecular medicine* 13, 169-183 (1998).
71. I. Chen, M. Howarth, W. Lin, A. Y. Ting, Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase. *Nature methods* 2, 99-104 (2005).
72. J. Yin, P. D. Straight, S. M. McLoughlin, Z. Zhou, A. J. Lin, D. E. Golan, N. L. Kelleher, R. Kolter, C. T. Walsh, Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15815-15820 (2005).
73. A. W. Kulczyk, N. A. Tanner, J. J. Loparo, C. C. Richardson, A. M. van Oijen, Direct observation of enzymes replicating DNA using a single-molecule DNA stretching assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (2010).
74. I. Wang, S. Y. Chen, S. T. Hsu, Unraveling the folding mechanism of the smallest knotted protein, MJ0366. *The journal of physical chemistry. B* 119, 4359-4370 (2015).
75. E. Gur, R. T. Sauer, Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA(+) protease. *Genes & development* 22, 2267-2277 (2008).
76. V. Baytshtok, T. A. Baker, R. T. Sauer, Assaying the kinetics of protein denaturation catalyzed by AAA+ unfolding machines and proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 5377-5382 (2015).
77. J. C. Cordova, A. O. Olivares, Y. Shin, B. M. Stinson, S. Calmat, K. R. Schmitz, M. E. Aubin-Tam, T. A. Baker, M. J. Lang, R. T. Sauer, Stochastic but highly coordinated protein unfolding and translocation by the ClpXP proteolytic machine. *Cell* 158, 647-658 (2014).
78. P. Szymczak, Periodic forces trigger knot untying during translocation of knotted proteins. *Scientific reports* 6, 21702 (2016).
79. M. Wojciechowski, A. Gomez-Sicilia, M. Carrion-Vazquez, M. Cieplak, Unfolding knots by proteasome-like systems: simulations of the behaviour of folded and neurotoxic proteins. *Molecular bioSystems* 12, 2700-2712 (2016).
80. X. R. Bao, H. J. Lee, S. R. Quake, Behavior of complex knots in single DNA molecules. *Physical review letters* 91, 265506 (2003).
81. A. Vologodskii, Brownian dynamics simulation of knot diffusion along a stretched DNA molecule. *Biophysical journal* 90, 1594-1597 (2006).
82. M. A. Soler, P. F. Faisca, Effects of knots on protein folding properties. *PloS one* 8, e74755 (2013).

## 10. MATERIAL SUPLEMENTARIO

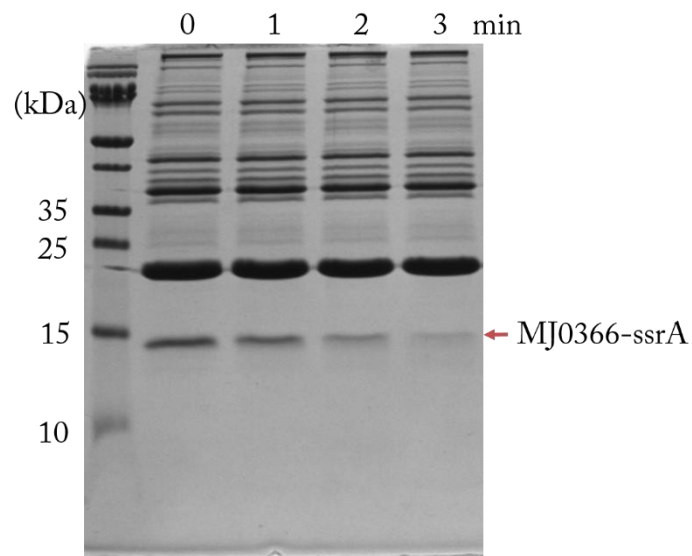


**Figura S1. Sustratos anudados que no se continuaron estudiando.** A) SDS-PAGE del test de expresión de los distintos sustratos anudados multidominio con las que se comenzó este proyecto. La expresión de las proteínas anudadas multidominio fue seguida por fluorescencia en gel, cargando los sobrenadantes obtenidos de la lisis de bacterias inducidas por 3 hr con 1 mM de IPTG. La expresión de GFP-VirC2-ssrA fue muy baja y tampoco logramos expresarla en otras cepas cepas como C41 y pLysS. GFP-Rds3p-ssrA tuvo baja expresión y se observa una banda con chorreo, claro signo de degradación en la célula. B) Ensayos de competencia utilizando GFP-Rds3p-ssrA como inhibidor, demuestran que esta proteína no es reconocida como sustrato por ClpXP, debido a que esta no es degradada ( $\blacktriangle$ ) no compite con GFP-ssrA ( $\blacklozenge$ ). Probablemente esta proteína de fusión carece del ssrA. C) La degradación de GFP-HP0242-ssrA no presentó mayor dificultad para ClpXP, degradando la proteína multidominio a velocidades similares a GFP-ssrA. Como HP0242 es 90 aminoácidos más grande que MJ0366, es probable que ClpXP degrade este sustrato anudado multidominio de manera similar a GFP-Titina<sup>90</sup>-ssrA.

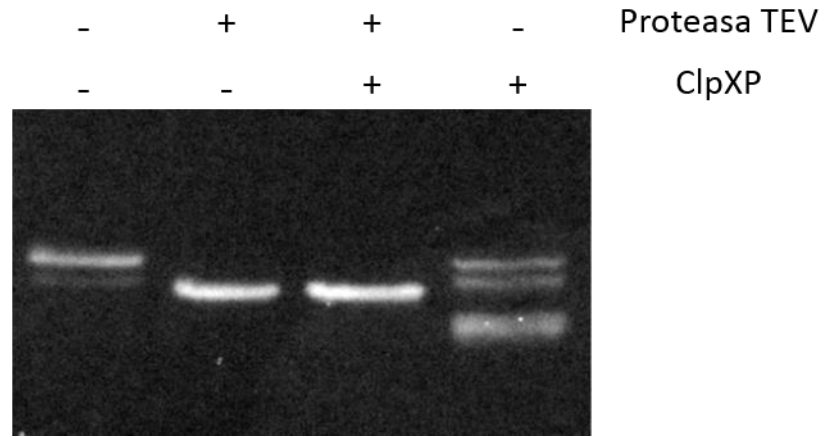




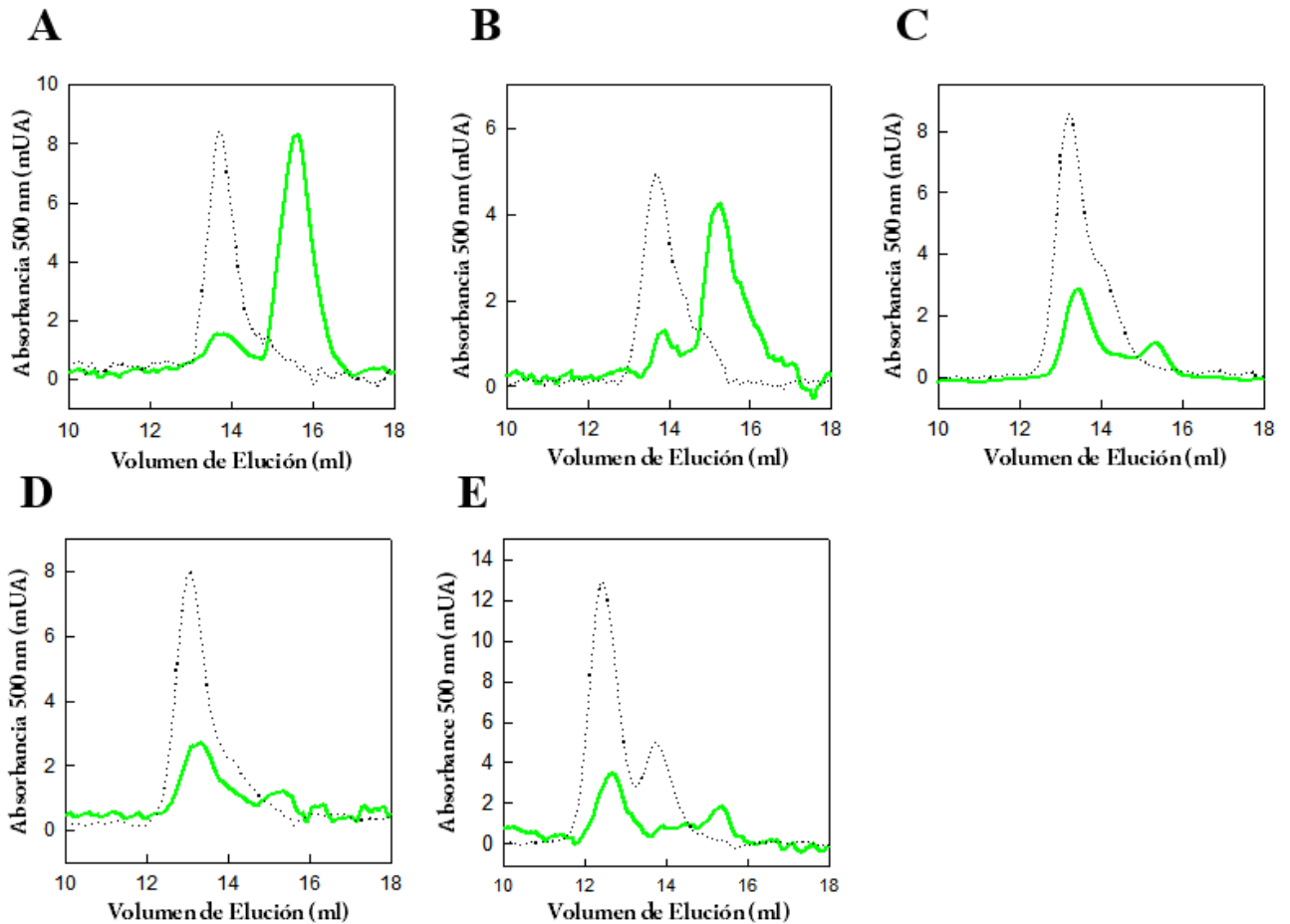
**Figura S2. Esquema experimentos de intercambio de subunidades.** Los homodímeros de GFP-MJ0366-ssrA son incubados con homodímeros de MJ0366-ssrA (izquierda). Como la interfase dimérica de estos homodímeros es la misma las los dominios de MJ0366 dimerizan aleatoriamente, formando heterodímeros con subunidades intercambiadas.



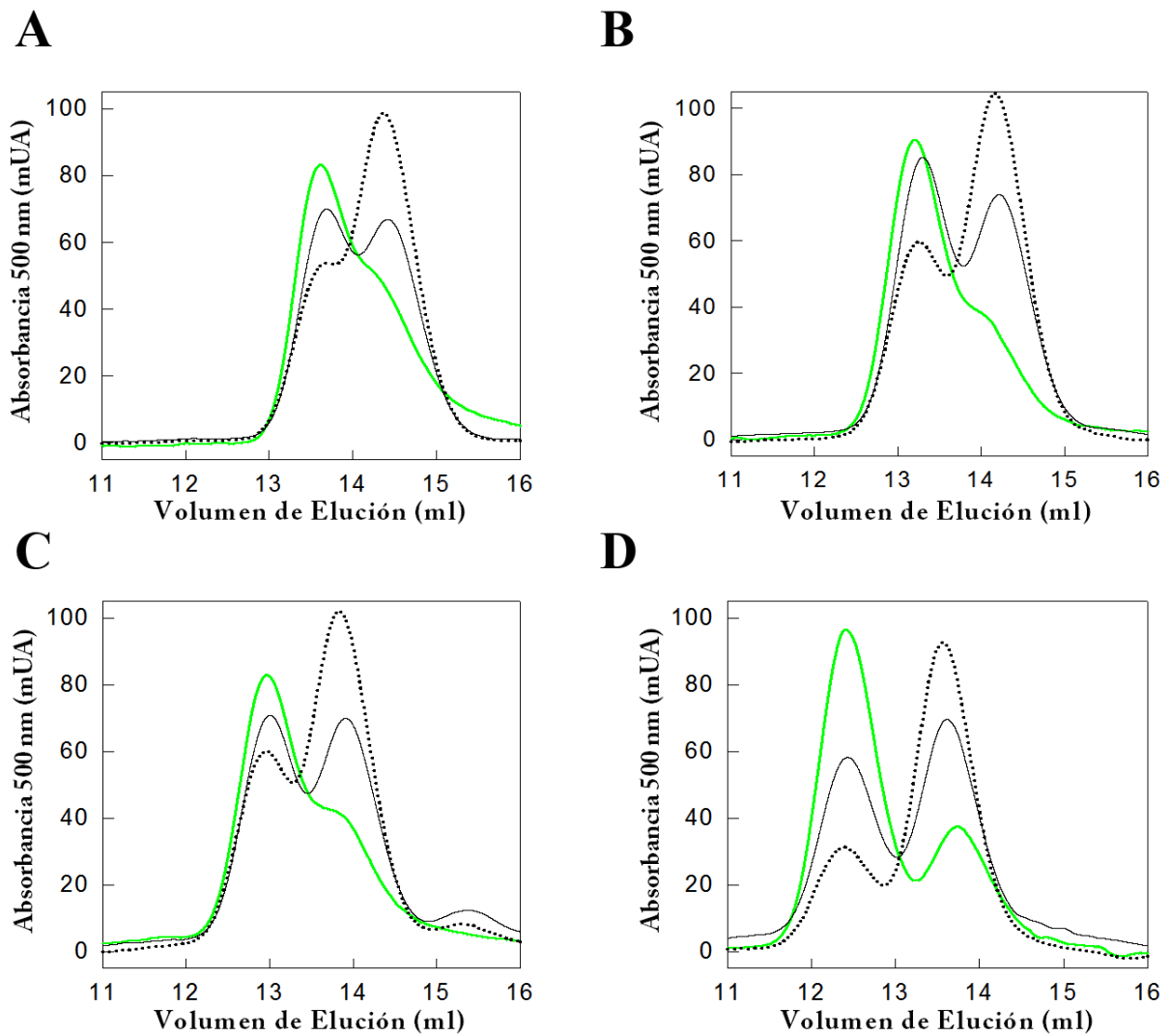
**Figura S3. MJ0366-ssrA es degradado sin generar productos de degradación parcial.** Cinética de degradación de MJ0366-ssrA seguida por tinción Coomassie en gel SDS-PAGE. No se observa formación de especies de menor peso molecular que MJ0366-ssrA.



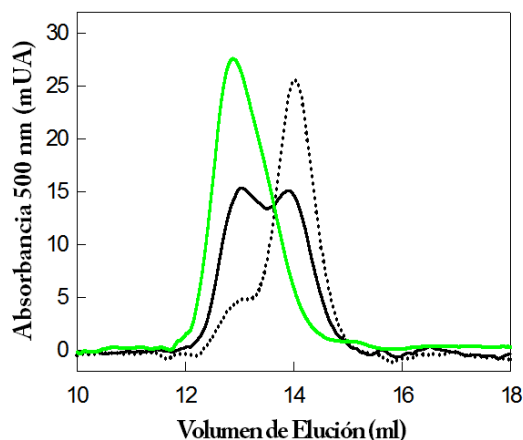
**Figura S4. Caracterización de banda fluorescente secundaria.** Fluorescencia en gel SDS-PAGE del sustrato multidominio GFP-MJ0366-ssrA, tratado con la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y/o ClpXP. La proteasa TEV realiza un corte proteolítico específico que permite escindir la señal ssrA del C-terminal del sustrato. El corte realizado por la proteasa TEV lleva a la formación de una única especie homogénea de menor tamaño, demostrando que la banda fluorescente secundaria carece del péptido señal ssrA en su extremo C-terminal. De la misma manera que la banda secundaria, la especie sin las señales en su C-terminal no es degradada por ClpXP.



**Figura S5. Cromatogramas de ensayos de degradación de sustratos multidominio.** Cromatogramas de los sustratos **A**) GFP-MJ0366-ssrA **B**) GFP-I27<sup>6</sup>-MJ0366-ssrA **C**) GFP-I27<sup>41</sup>-MJ0366-ssrA **D**) GFP-I27<sup>61</sup>-MJ0366-ssrA and **E**) GFP-I27<sup>91</sup>-MJ0366-ssrA incubados por 2 horas en presencia de ClpXP (—) o en ausencia de ClpXP (····).



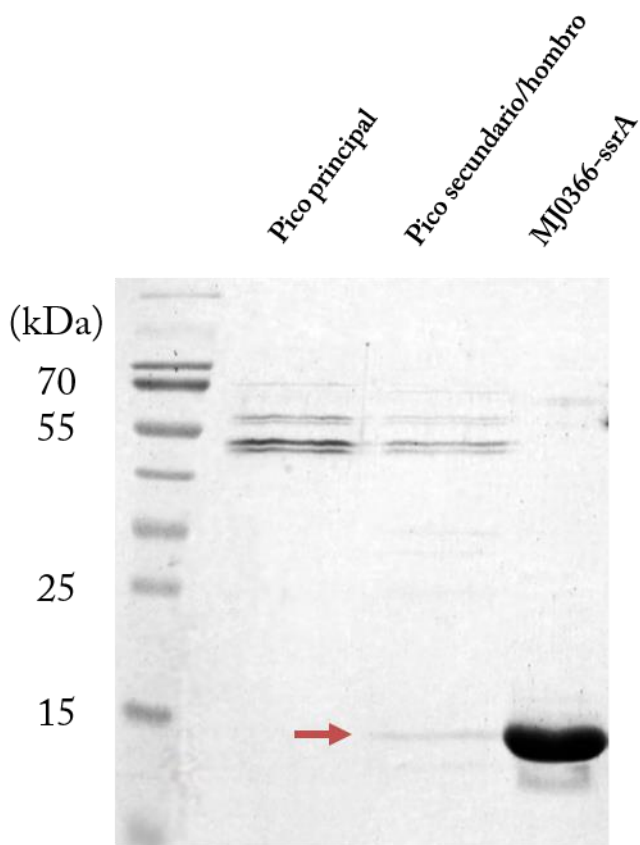
**Figura S6. Sustratos con espaciador de titina están anudados.** Cromatografías de exclusión molecular de los sustratos con espaciador de Titina; **A)** GFP-Titina<sup>6</sup>-MJ0366-ssrA, **B)** GFP-Titina<sup>41</sup>-MJ0366-ssrA, **C)** GFP-Titina<sup>61</sup>-MJ0366-ssrA y **D)** GFP-Titina<sup>90</sup>-MJ0366-ssrA. Los cromatogramas seguidos a 500 nm de las preparaciones de los sustratos multidominio (—) muestran un pico principal del tamaño esperado para el homodímero de cada sustrato respectivo (Tabla 2). Al incubar los sustratos multidominio con MJ0366-ssrA en concentraciones equimolares (—) o con un exceso de MJ0366-ssrA (•••) se observa la formación de una nueva especie de menor peso molecular.



**Figura S7. GFP-MJ0366-Titina-ssrA se pliega correctamente.** Cromatogramas de exclusión molecular seguidos a 500 nm del sustrato GFP-MJ0366-Titina-ssrA solo (—), incubado con una cantidad equimolar de MJ0366-ssrA (—) o con un exceso de MJ0366-ssrA (···).

**Tabla S1. Peso molecular GFP-MJ0366-Titina-ssrA**

Sustrato	Peso Molecular S.E.C. (kDa)	Peso molecular Dímero teórico (kDa)
GFP-MJ0366-Titina-ssrA	105	106



**Figura S8. Caracterización de hombros cromatográficos.** Gel SDS-PAGE de fracciones colectadas de la cromatografía de exclusión molecular de GFP-titina<sup>90</sup>-MJ0366-ssrA. El pico principal está formado por el sustrato multidominio completo (54 kDa) y el pico secundario u hombro, presenta una contaminación con peso molecular similar a MJ0366-ssrA

**Tabla S2. Grado de contaminación de las preparaciones**

<b>Sustrato</b>	<b>% Monómeros MJ0366-ssrA <sup>a</sup></b>
GFP-MJ0366-ssrA	20
GFP-Titina <sup>6</sup> -MJ0366-ssrA	27
GFP-Titina <sup>41</sup> -MJ0366-ssrA	15
GFP-Titina <sup>61</sup> -MJ0366-ssrA	20
GFP-Titina <sup>90</sup> -MJ0366-ssrA	27

<sup>a</sup> El porcentaje de heterodímeros fue determinado por el porcentaje del área del hombro con respecto al área total del pico cromatográfico a 500 nm (Fig.S5). A partir del porcentaje de heterodímeros se calculó el porcentaje de monómeros de MJ0366-ssrA con respecto a los monómeros totales de cada preparación.