

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**“Estudio de las propiedades funcionales y estructurales de la proteína de estrés térmico BiP (Proteína de Unión a Inmunoglobulina). Un regulador maestro con importante rol terapéutico”**

**Miguel Ignacio Alberto Lagos Espinoza**

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

**Director de memoria: Dr. Christian A.M. Wilson Moya**

**Codirectora de memoria: Dra. Nathalie Casanova-Morales**

**2023**

**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 Memoria de Título presentada por el candidato

**Miguel Ignacio Alberto Lagos Espinoza**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Químico Farmacéutico el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

Dr. Christian A. M. Wilson Moya

\_\_\_\_\_

**Codirectora de Tesis:**

Dra. Nathalie Casanova Morales

\_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

Dr. Alejandro Álvarez Lueje

\_\_\_\_\_

Dra. Mario Rivera Meza

\_\_\_\_\_

**LUGAR DE DESARROLLO DE LA TESIS:**

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

Edificio de Artes liberales, Facultad de Artes Liberales, Universidad Adolfo Ibáñez, Santiago, Chile.

**Financiamiento:**

Proyecto Fondecyt Chile, Código: 1181361: Mechanochemical mechanism of BiP protein and its role in proteostasis and protein translocation 2018-2022.

## **Agradecimientos**

Quiero partir agradeciendo a las mujeres que me criaron y siempre me dieron su apoyo, mi abuelita Catalina Herrera, mi mamá María Cecilia Espinoza, mi tía Roxette Espinoza, mi hermana María José y mi ahijada Catalina Emilia.

Gracias a mi eterno dúo, mi papá Miguel Lagos R. y mi hermanito Nicolas Lagos por esos días hasta tarde haciendo experimentos, quienes siempre creyeron en mí, nunca dudaron y me dieron todo su cariño y ayuda sin pensarlo.

Para Leonardo Muñoz, el hermano que yo elegí, con quien nunca falta la risa, el hombro en el llanto, el abrazo apretado y el momentopreciado, gracias manito.

Agradecido de mi reina hermosa, Valeria Jasmín Rojas González, con quien he podido compartir nuestro crecimiento como compañeros, pareja, personas y profesionales. No hay momento que no me sienta orgulloso de ti, te amo mucho.

Profesor Christian Wilson, gracias por mostrarme la real Bioquímica, la pasión por hacer ciencia, la importancia de esta y todas las oportunidades para crecer como científico con pasantías, congresos, participación en papers, etc. Jamás terminaré de agradecerle por darme la confianza que ahora tengo en mi.

Gracias a Diego Quiroga Roger (Quirogol) por enseñarme como desenvolverme en la ciencia, la ayuda en cada experimento, los dogmas de un laboratorio y de un científico, los cuales aplico en cualquier laboratorio, donde sea que tengo que hacer experimentos, además de compartir la buena música y el consejo certero.

Gracias a Nathalie Casanova por aceptar ser mi co-tutora, por la ayuda en mi primer congreso, en mi primera pasantía en el extranjero y por toda la ayuda en la escritura de esta tesis y su paciencia.

A mis compañeros de laboratorio Hilda Alfaro, Valentina Carrasco, Francesca Burgos, Luka Robeson y Cristóbal Olivares por su valiosa amistad, por su crítica constructiva, retroalimentación e inspiración para mejorar como persona y como profesional.

Finalmente, debo mencionar a las QFs que contaron conmigo y me dieron su apoyo para desarrollarme como farmacéutico en la práctica, a Daniela Mamani, Daniela López, Pamela Colonelli y Jimena Dissett, gracias por darme los momentos que te forman en la farmacia.

**A todos, agradecido, muy agradecido!!!**

## Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 El rol del retículo endoplásmico.....	1
1.2 BiP, un regulador maestro del retículo endoplasmático .....	1
1.3 BiP y su importancia Biomédica .....	1
1.4 Un análisis estructural de BiP.....	2
1.5 Ciclo catalítico de BiP .....	3
<b>2. PROPUESTA</b> .....	5
2.1 Hipótesis .....	5
2.2 Objetivo general .....	6
2.3 Objetivos específicos .....	6
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	6
3.1 Materiales: .....	6
3.2 Instrumentos y equipos:.....	7
3.3 Métodos .....	7
3.3.1 Diseño experimental para la generación de la mutante P193G mediante mutación sitio dirigida de BiP utilizando su ADN nativo.....	7
3.3.2 Transformación de bacterias competentes con el plásmido mutado .....	9
3.3.3 Extracción de DNA mutado .....	9
3.3.4 Transformación de ADN .....	10
3.3.5 Pasos de la purificación de la proteína BiP nativa y su mutante P193G.....	11
3.3.6 Ensayo de desplegamiento para analizar la presencia de ATP proveniente de la purificación. ....	14
3.3.7 Caracterización enzimática de BiP y su mutante mediante un ensayo acoplado a enzimas auxiliares.....	15

<b>4. RESULTADOS</b> .....	17
4.1 -Objetivo específico 1: Diseñar, obtener y purificar la proteína BiP mutada de levadura para su desacoplo alostérico. ....	17
4.1.1 Diseño de partidores, obtención y secuenciación de mutación sitio dirigida de BiP WT .....	17
4.1.2. Purificación e identificación de BiP WT y BiP P193G.....	19
4.1.3 Ensayo de desplegamiento para analizar la presencia de ATP proveniente de la purificación. ....	22
4.2. -Objetivo específico 2: Comparar estructuralmente BiP nativa y su mutante P193G ...	22
4.2.1 Comparación estructural entre BiP WT y su mutante P193G.....	22
4.3 -Objetivo específico 3: Determinar las propiedades cinéticas de BiP nativa y su mutante alostérica P193G.....	23
4.3.1 Medición de actividad enzimática de BiP y su mutante P193G.....	23
4.3.2 Efecto del péptido HTFPAVL en los parámetros cinéticos para BiP WT y su mutante P193G.....	25
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	27
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	29
<b>7. PROYECCIONES</b> .....	30
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	31
<b>9. ANEXOS</b> .....	35
Anexo 1: Secuencia nucleotídica de DnaK. ....	35
Anexo 2: Secuencia nucleotídica de BiP.....	36

## Índice de figuras

<b>Fig. 1 Fig. 1 Estructura BiP-ATP (PDB:5E84).....</b>	<b>3</b>
<b>Fig. 2 Comparación de la estructura BiP-ATP humana (PDB:5E84) con la estructura DnaK-ATP (PDB: 4JNE).....</b>	<b>4</b>
<b>Fig. 3 Estructura de BiP mutante P193G realizada con la herramienta de visualización molecular PyMol.....</b>	<b>5</b>
<b>Fig. 4 Mutación sitio dirigida utilizando ADN nativo de BiP mediante PCR.....</b>	<b>8</b>
<b>Fig. 5 Extracción de ADN mutado de BiP desde la cepa XL10.....</b>	<b>10</b>
<b>Fig. 6 Preparación de plásmidos mutantes de BiP para expresión en la cepa de <i>E. coli</i> BL21.....</b>	<b>11</b>
<b>Fig. 7 Método de sobre expresión y purificación de BiP WT y su mutante P193G.....</b>	<b>13</b>
<b>Fig. 8 Concentración de fracciones de BiP en tubos Amicon® 10K .....</b>	<b>14</b>
<b>Fig. 9 Esquema de la medición catalítica de BiP acoplado a enzimas auxiliares.....</b>	<b>16</b>
<b>Fig. 10 Secuencias nucleotídicas alineadas de DnaK y BiP WT, además de partidores diseñados para mutación sitio dirigida de BiP.....</b>	<b>18</b>
<b>Fig. 11 Secuencia nucleotídica de BiP mutante corroborada por Sequetech.....</b>	<b>19</b>
<b>Fig. 12 Experimentos de detección e identificación de BiP WT.....</b>	<b>20</b>
<b>Fig. 13 Experimentos de detección e identificación de BiP P193G.....</b>	<b>20</b>
<b>Fig. 14 SDS- PAGE al 12% en condiciones denaturantes de las muestras concentradas de BiP WT y BiP P193G.....</b>	<b>21</b>
<b>Fig. 15 Espectros de dicroísmo circular para BiP WT y BiP P193G (210-220nm).....</b>	<b>23</b>
<b>Fig. 16 Grafico de actividad enzimática de BiP WT y BiP P193G a distintas concentraciones de ATP y efecto del péptido HTFPAVL.....</b>	<b>25</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1. Medición por espectrofotometría a 260 nm de ADN de BiP P193G.....</b>	<b>18</b>
<b>Tabla 2. Concentración y pureza de BiP WT y BiP P193G.....</b>	<b>21</b>
<b>Tabla 3. Valores de absorbancia del barrido espectral para cuantificar la concentración de ATP en las muestras purificadas de BiP WT y BIP P193G. ....</b>	<b>22</b>
<b>Tabla 4. Valores de pendientes de absorbancia en el tiempo para BiP WT y BIP P193G a concentraciones crecientes de ATP.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabla 5. Parámetros cinéticos y efecto del péptido HTFPAVL para la proteína BiP WT y BiP P193G.....</b>	<b>26</b>



## Abreviaturas

<b>A</b>	Adenina o Alanina
<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosindifosfato
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfato
<b>BiP</b>	Proteína de Unión a Inmunoglobulina
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>C</b>	Citosina
<b>COVID-19</b>	Enfermedad del CoronaVirus 2019
<b>dsADN</b>	ADN de doble hebra
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>F</b>	Fenilalanina
<b>G</b>	Glicina o Guanina
<b>H</b>	Histidina
<b>Hi</b>	Aminoácido hidrofóbico o aromático
<b>His tag</b>	Cola de Histidinas
<b>Hsp70</b>	<i>Heat shock protein 70</i>
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>K<sup>+</sup></b>	Ion Potasio
<b>KCl</b>	Cloruro de Potasio
<b>L</b>	Lisina
<b>LB</b>	Caldo Luria
<b>LDH</b>	Lactato Deshidrogenasa
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	Ion Magnesio
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Ion Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio
<b>NBD</b>	<i>Nucleotide Binding Domain</i> (Dominio de Unión de Nucleótidos)
<b>Ni<sup>+2</sup></b>	Ion Níquel
<b>P</b>	Prolina
<b>PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>PeP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>Pi</b>	Fosforo inorgánico
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PK</b>	Piruvato Kinasa
<b>SARS-CoV-2</b>	Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo

<b>SBD</b>	<i>Substrate Binding Domain</i> (Dominio de Unión de Sustrato)
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SOC</b>	<i>Super Optimal broth with Catabolite represión</i> (Caldo super optimo con represión catabólica)
<b>T</b>	Timina o Tirosina
<b>UPR</b>	<i>Unfolding protein response</i>
<b>V</b>	Valina
<b>W</b>	Triptófano
<b>WT</b>	<i>Wild tipe</i>
<b>X</b>	Cualquier aminoácido

## Unidades de medida utilizadas en esta tesis

<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>cm</b>	Centímetro
<b>g</b>	Fuerza de gravedad
<b>mg</b>	Miligramo
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L</b>	Litro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>μL</b>	Microlitro
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>μM</b>	Micromolar
<b>mdeg</b>	Miligrados
<b>min</b>	Minuto
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>ttotal</b>	Tiempo total de medición
<b>U.I.</b>	Unidad internacional
<b>V</b>	Velocidad
<b>Vmax</b>	Velocidad máxima

## Resumen

BiP es una chaperona perteneciente a la familia Hsp70 (Heat shock protein 70) que está involucrada en la regulación de importantes procesos biológicos como la síntesis, plegamiento, translocación y degradación de otras proteínas en el retículo endoplásmico de la célula eucarionte. Esta chaperona tiene dos dominios comunicados entre sí para modular su actividad catalítica; un Dominio de Unión de Nucleótidos (NBD), en el extremo N-terminal, que interacciona con nucleótidos, por ejemplo, hidrolizando ATP y uniendo ADP, y el Dominio de Unión de Sustrato (SBD), en el extremo C-terminal, que une proteínas desplegadas. En estudios previos se ha demostrado que una proteína de la misma familia, DnaK de bacteria (*E. coli*), tiene una comunicación alostérica entre los dos dominios a través de un residuo de Prolina en la posición 143, pero los residuos involucrados en la comunicación inter-dominios de BiP no se han estudiado. En este trabajo se usó BiP de levadura (*S. cerevisiae*) y se estudió la comunicación alostérica entre SBD y NBD haciendo una comparación directa entre BiP y DnaK en su secuencia de aminoácidos. Se generó una mutación sitio dirigida de BiP, cambiando la Prolina 193 (equivalente a la 143 de DnaK) por una Glicina en la misma posición a través de partidores diseñados por herramientas bioinformáticas como PDB (*Protein Data Bank*) y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Luego, para obtener más copias del ADN mutado de BiP de levadura, se utilizó la línea celular de bacterias XL10. Por otra parte, el ADN mutado de BiP se traduce a proteínas por la línea celular de bacterias BL21. Una vez sobre expresada ambas proteínas, éstas se purifican mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna pre empacutada con Níquel. Una vez eluidas las proteínas, BiP WT y su mutante se caracterizaron por dicroísmo circular, demostrando que su estructura no se modifica por la mutación sitio dirigida. Para saber el rol del residuo de Prolina mutado en la comunicación entre dominios de la chaperona, se realizó un ensayo cinético acoplado a enzimas auxiliares para el cálculo de los parámetros cinéticos de las proteínas en presencia y ausencia de un sustrato peptídico activador de BiP (HTFPAVL). Se demostró que BiP WT presentó 4 veces mayor actividad enzimática ( $7.7e^{-5}$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) que P193G ( $1.6e^{-5}$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ ). Además, la interacción del péptido activador aumentó la actividad enzimática de BiP nativa pero no mostró efecto en la actividad de la mutante de BiP P193G. En términos de afinidad por ATP ( $K_m$ ) BiP nativa presentó mayor afinidad (24  $\mu\text{M}$ ) a diferencia de P193G (13 $\mu\text{M}$ ), pero en condición de presencia del péptido activador la mutante P193G presentó un aumento de 4 veces en la afinidad por ATP (45  $\mu\text{M}$ ). Estos resultados nos dan una idea por primera vez de que el residuo de Prolina 193 puede estar involucrado en la comunicación alostérica inter dominios en la proteína BiP.

## Abstract

BiP is a chaperone belonging to the Hsp70 family (Heat shock protein 70) that is involved in the regulation of important biological processes such as the synthesis, folding, translocation and degradation of other proteins in the endoplasmic reticulum of eukaryotic cells. This chaperone has two interconnected domains to modulate its catalytic activity; a Nucleotide Binding Domain (NBD), at the N-terminus, which interacts with nucleotides, for example, hydrolyzing ATP and binding ADP, and the Substrate Binding Domain (SBD), at the C-terminus, which binds unfolded proteins. In previous studies, it has been shown that a protein from the same family, DnaK from bacteria (*E. coli*), has allosteric communication between the two domains through a Proline residue in the position 143, but the residues involved in BiP interdomain communication have not been studied. In this work we use BiP from *S. cerevisiae*, a eukaryotic organism closer to humans than bacteria, and study the allosteric communication between SBD and NBD by doing a direct comparison between the yeast BiP and DnaK in their aminoacidic sequence. We generate a site directed mutation of BiP, changing the Proline 193 (equivalent to the 143 from DnaK) for a Glycine in the same position through primers designed by bioinformatics tool such as PDB (Protein Data Bank) and BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Then, to obtain more copies of the mutated DNA of yeast BiP, the XL10 bacteria cell line was used. Subsequently, the mutated BiP DNA is translated into proteins by the BL21 bacterial cell line. Once both proteins are overexpressed, the proteins are purified by affinity chromatography using a pre-packed column with Nickel. Once the proteins were eluted, BiP WT and its mutant were characterized by circular dichroism, demonstrating that their structure are not modified by the site-directed mutation. To determine the role of the mutated Proline residue in the communication between chaperone domains, a kinetic coupled assay with auxiliary enzymes was performed to calculate the kinetic parameters of the proteins in the presence and absence of a BiP-activating peptide substrate (HTFPAVL). It was shown that BiP WT presented 4 times greater enzymatic activity ( $7.7e^{-5}$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) than P193G ( $1.6e^{-5}$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ ). In addition, the activator peptide interaction increased the enzymatic activity of native BiP but did not show an effect on the activity of the BiP mutant P193G. In terms of affinity for ATP ( $K_m$ ), native BiP presented a higher affinity (24  $\mu\text{M}$ ) than P193G (13  $\mu\text{M}$ ), but in the presence of the activating peptide, the P193G mutant presented a 4-fold increase in affinity for ATP (45  $\mu\text{M}$ ), these results give us insight for the first time that the residue Proline 193 may be involved in inter-domain allosteric communication in the BiP protein.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El rol del retículo endoplásmico

Dentro de las células de los mamíferos un tercio de las proteínas se ensamblan y pliegan en el retículo endoplasmático (RE) [1]. Este organelo está involucrado en la síntesis de proteínas, el plegamiento, ensamblaje, transporte y secreción de estas [2]. Una de las funciones más importantes del RE implica el control de calidad de las proteínas nacientes, lo que es llevado a cabo por proteínas chaperonas [3][4]. Las chaperonas son proteínas que ayudan a otras proteínas en la obtención de la estructura tridimensional correcta, facilitando las vías de plegado correctas o proporcionando microambientes en los que puede producirse el plegamiento [5].

## 1.2 BiP, un regulador maestro del retículo endoplasmático

Uno de los acompañantes más importantes en los procesos antes mencionados es la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP). BiP es una ATPasa monomérica perteneciente a la familia de las proteínas de estrés térmico de 70 kDa (Del inglés *Heat shock protein 70*), la cual ha sido referida como el regulador maestro del RE debido a los amplios y cruciales roles que desempeña en los variados procesos y funciones antes mencionados del RE [6]. BiP tiene varias funciones, entre ellas, se encuentra la capacidad de apoyar translocación de proteínas al lumen del RE y como chaperona. En el caso de la translocación, BiP se une a una gran variedad de proteínas nacientes que entran al lumen del RE, las cuales se unen gracias a un motivo heptamérico, Hi (W o X)-Hi-X-Hi-X-Hi, donde Hi es un residuo hidrofóbico o aromático, W es triptófano y X corresponde a cualquier aminoácido [7], evitando que estas se plieguen incorrectamente o que polimericen entre ellas. Como chaperona, BiP interacciona con proteínas nacientes inmaduras sintetizadas por polisomas unidos a membrana. Estos mecanismos evitan desnaturalización de proteínas inmaduras o su degradación, además de asegurar el correcto plegamiento de estas y adaptación en caso de estrés en el RE [2].

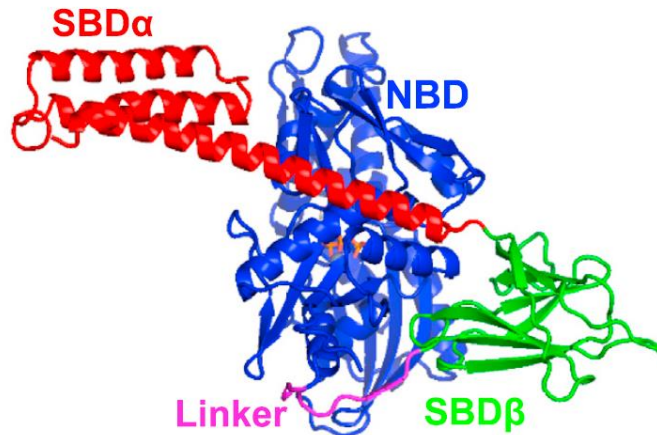
## 1.3 BiP y su importancia Biomédica

A nivel fisiológico, estos procesos de control de calidad en el RE son de suma importancia en la proteostasis (ciclo de vida de una proteína). Cabe mencionar que existe evidencia que

muchas enfermedades crónicas que afectan a la población se deben a un mal control de estos mecanismos de plegamiento de proteínas, como es el caso de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson, entre otros [8]. Así mismo, se ha detectado sobreexpresión de BiP en varios tipos de cáncer ejerciendo una acción citoprotectora en la oncogénesis [9][10]. Pero, por otra parte, genera resistencia a varios fármacos quimioterapéuticos, ya que el bloqueo en la expresión de BiP aumenta la sensibilidad de las células tumorales a tratamiento oncológico [11]. También, en el transcurso de la pandemia del SARS-CoV-2 que azotó al mundo entre el año 2020 y 2021, estudios indican que BiP se involucra directamente en facilitar la infección y replicación del virus en células del epitelio alveolar [12][13], lo cual indica que la chaperona BiP es un blanco terapéutico potencial para fármacos antivirales para el tratamiento del COVID-19 [14]. Entonces, la investigación sobre el funcionamiento de BiP implicaría un papel indispensable para caracterizar su mecanismo, además de analizar su posible rol en el tratamientos y terapias en enfermedades que afectan a la población mundial.

#### **1.4 Un análisis estructural de BiP**

Estructuralmente, BiP está formada por dos dominios: un dominio de unión a nucleótido (Del inglés *Nucleotide Binding Domain*; NBD) en el extremo N-terminal, donde se presenta la actividad ATPasa. Este dominio está conectado por un puente de aminoácidos hidrofóbicos (*linker*) al dominio de unión a sustrato (Del inglés *Substrate Binding Domain*; SBD) en el extremo C-terminal, donde se unen proteínas en estado desplegado. Por otra parte, el SBD está compuesto por dos subdominios, el SBD $\beta$  y SBD $\alpha$ . SBD $\beta$  está formado principalmente por hojas  $\beta$  y es donde se genera la unión a proteínas desplegadas (**Fig. 1**). El SBD $\alpha$  está conformado principalmente por  $\alpha$ -hélices, las que actúan como una “tapa” para evitar la pérdida del sustrato [15].



*Fig. 1 Estructura BiP-ATP (PDB:5E84). La coloración de los dominios de BiP-ATP es: NBD (azul), el linker (rosado), SBD $\alpha$  (rojo), SBD $\beta$  (verde) y ATP (naranja). Modificada de la figura 3B de la referencia [15].*

### 1.5 Ciclo catalítico de BiP

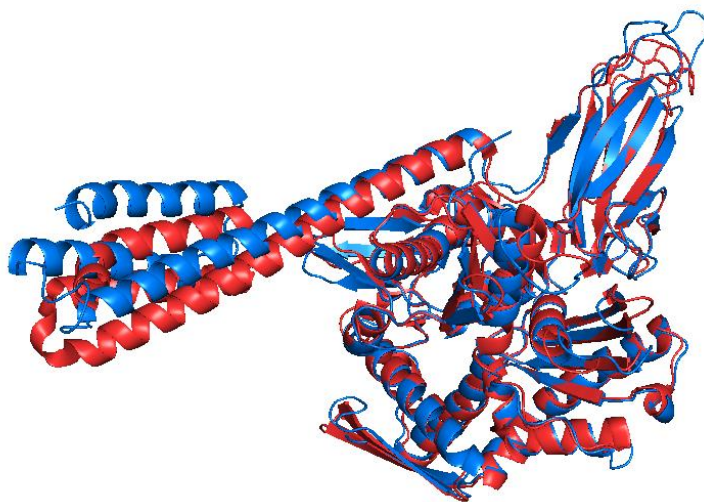
Muchos cambios conformacionales están asociados a la actividad ATPasa de BiP. Entre estos están la apertura y cierre del SBD $\alpha$ , y la variación de distancia que existe entre NBD y SBD. Pero la hidrólisis de ATP por sí misma no lleva a que ocurran estos cambios conformacionales.

Es necesario mencionar que la actividad catalítica de BiP también está regulada por cationes mono y divalentes, como es el caso de  $K^+$  y  $Mg^{+2}$  [4]. BiP cuenta con dos sitios de unión para estos iones, los cuales interactúan directamente con los grupos fosfatos provenientes de la hidrólisis de ATP [16].

Una vez que BiP une tanto ATP como  $K^+$ , sus dominios se acercan y la “tapa” del SBD se abre, lo cual genera la interacción con proteínas desplegadas, pero de manera reversible. Posteriormente, al generarse la hidrólisis de ATP mediada por  $Mg^{+2}$  en ADP aumenta la frecuencia de unión de proteínas en estado no plegado, donde el subdominio SBD $\alpha$  se cierra sobre el sustrato unido al SBD $\beta$  [7]. Para terminar el ciclo catalítico de BiP, ambos dominios, NBD y SBD, se separan uno del otro posterior a la unión del ADP formado y este debe ser reemplazado por un nuevo ATP para que se genere la liberación de la proteína desplegada y así la chaperona BiP quede disponible para generar otro ciclo catalítico [4]. Como se puede apreciar, todo el ciclo catalítico de BiP es ampliamente regulado por un complejo mecanismo alostérico, el cual trasmite la información de la unión de nucleótidos desde NBD al SBD y el



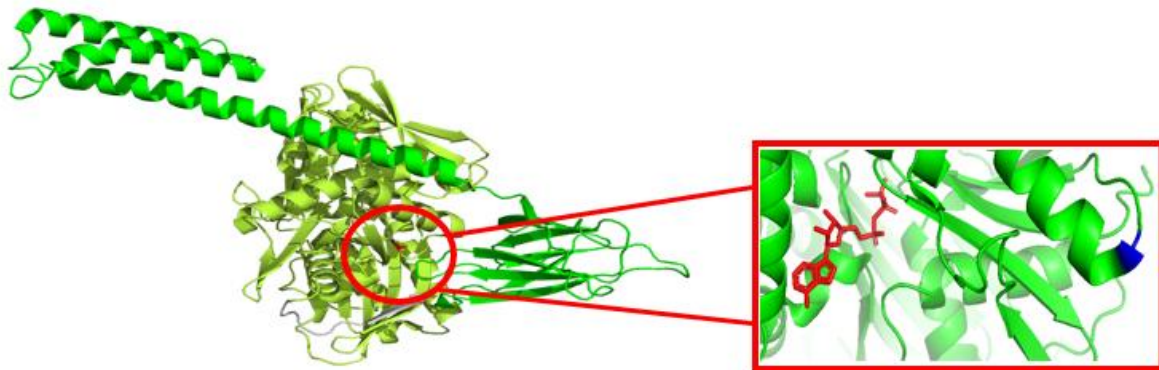
estado de ocupación del sustrato desde SBD de vuelta al NBD. Se ha observado cambios viscoelásticos en BiP al interactuar con sus distintos sustratos, al estar en presencia de sustratos peptídicos la proteína se vuelve rígida y en la unión de nucleótido esta se vuelve más suave. En este caso, las mediciones de afinidad indican que la unión de péptidos aumenta la afinidad por ADP [17]. Sin embargo, aún no está del todo claro el rol que juegan los aminoácidos involucrados en este mecanismo de comunicación interdominios (alosterismo). Diferentes ideas han surgido en torno a lo antes mencionado pero basada en la investigación de otras chaperonas pertenecientes a las Hsp70, como es el caso de la de DnaK de *E. coli*, la cual es muy similar en estructura aminoacídica a BiP (**Fig. 2**). Es sabido que un particular residuo de prolina en DnaK (Prolina 143) se encuentra en el NBD cercano al sitio de unión de ATP. Este residuo, una vez reemplazado desestabiliza la comunicación alostérica, aumentando la tasa de transición espontánea de estados de unión a ATP a estados de unión a ADP, indicando la probabilidad de que el residuo antes mencionado sufre isomerización cis/trans [18]. Curiosamente, este residuo involucrado en la catálisis de DnaK está conservado en la secuencia aminoacídica de BiP [19][4] y la identidad en secuencia aminoacídicas de ambas proteínas es sobre el 52%, información corroborada por herramientas bioinformáticas [20]. A pesar de ello, el impacto de esta mutación (aminoácido P193 en BiP de levadura) a nivel estructural, funcional y termodinámico de BiP no ha sido investigado.



*Fig. 2 Superposición de la estructura BiP-ATP humana (PDB:5E84) con la estructura DnaK-ATP (PDB:4JNE). La estructura azul corresponde a BiP-ATP (azul). La estructura roja corresponde a DnaK-ATP. Figura generada con el programa PyMOL.*

## 2. PROPUESTA

A partir de lo anteriormente presentado, y tomando en cuenta la información con relación a la similitud en identidad aminoacídica de BiP y DnaK, se propone llevar a cabo una “**caracterización de la estabilidad estructural, funcional y termodinámica de la Hsp70 Proteína de Unión a Inmunoglobulina (BiP) y su mutante P193G con el fin de analizar el desacoplo alostérico entre SBD y NBD**”. Con la información en la literatura sobre DnaK de *E. coli* [18], su mecanismo alostérico y de los aminoácidos involucrados en dicho proceso, permita tener una idea que ocurre en el caso de BiP de *S. cerevisiae*, ya que la información al respecto de los residuos involucrados en el alosterismo de BiP no está completamente clara. Además, *S. cerevisiae* es un organismo eucarionte, modelo más cercano al humano que bacteria. Esta propuesta busca demostrar sí la mutación equivalente en levadura (**Fig. 3**) es importante en el proceso alostérico de BiP desde un punto de vista funcional.



*Fig. 3 Estructura de BiP mutante P193G realizada con la herramienta de visualización molecular PyMol. La coloración de los dominios de BiP-ATP (PDB:5E84) es: SBD (verde oscuro), NBD (verde claro). En el acercamiento se observa la estructura de ATP (rojo) y el aminoácido Glicina (G; Azul).*

### 2.1 Hipótesis

La mutación sitio dirigida de la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP) en la Prolina (P; aminoácido rígido) 193 por una Glicina (G; aminoácido flexible) genera una pérdida del

proceso de alosterismo que existe entre los dominios de BiP, el dominio de unión a nucleótido (NBD) y el dominio de unión a sustrato (SBD).

## **2.2 Objetivo general**

Realizar una comparación estructural y cinética entre BiP nativa de *S. cerevisiae* y su mutante P193G para observar si el residuo mutado juega un papel en el alosterismo (comunicación interdominio) de la proteína.

## **2.3 Objetivos específicos**

- 1.-Diseñar, obtener y purificar la proteína BiP mutada de levadura para su desacoplo alostérico.
- 2.- Comparar estructuralmente BiP nativa y su mutante P193G.
- 3.- Determinar las propiedades cinéticas de BiP nativa y su mutante alostérica P193G.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Materiales:**

La descripción de materiales corresponde a: Material (empresa, número de catálogo)

Gen de la Proteína de Unión a Inmunoglobulina (BiP) con cola de Histidinas en el extremo N-terminal (donado por Dr. Jeffrey Brodsky, Pittsburgh University), Acrilamida (Invitrogen, 15512023), AgarAgar (Merck, 1016141000, Albumin, Bovine. Fraction V (BSA; Sigma Chemical Company,A-4503), Ampicilina (Sigma, A0166-266), Adenosine Triphosphate (ATP; Meia Haiian Pharmaceutical Co., 2934999090),  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, M6250),  $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced dipotassium salt (NADH; Sigma,N4505), Cloruro de Guanidinio (Thermo Scientific, 24115), Cloruro de Sodio (NaCl; New England BioLabs, R0193S), Coomassie® Brilliant Blue R250 (Merck, 42660), Ditiotreitolo (DTT; GoldBio, 27562-41-9), Extracto de levadura (Winkler, 212750), Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; Sigma, 78830-1G), HEPES (Sigma, H4034), Heptapeptido HTFPAVL (Biomatik corp. 770494496486), Imidazol (UsBiological, 288-32-4), Isopropil-B-D-1-tiogalactopiranosodico (IPTG; Gold-Bio, 12481C25), Lactate Dehydrogenase (LDH; Roche, 10127876001), Leupeptina (Sigma, L0649-5MG), Magnesium chloride hexahydrate

(MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O; Merck, 1058331000), Pepstatina (Merck, 72161000), Phosphoenol pyruvate (PeP; Roche, 10108294001), Piruvate Kinase (PK; Roche, 10109045001), Potassium chloride (KCl; MP Biomedicals, Peptona (Merck, 7651), Reactivo de Bradford (Bio-Rad/5000006).

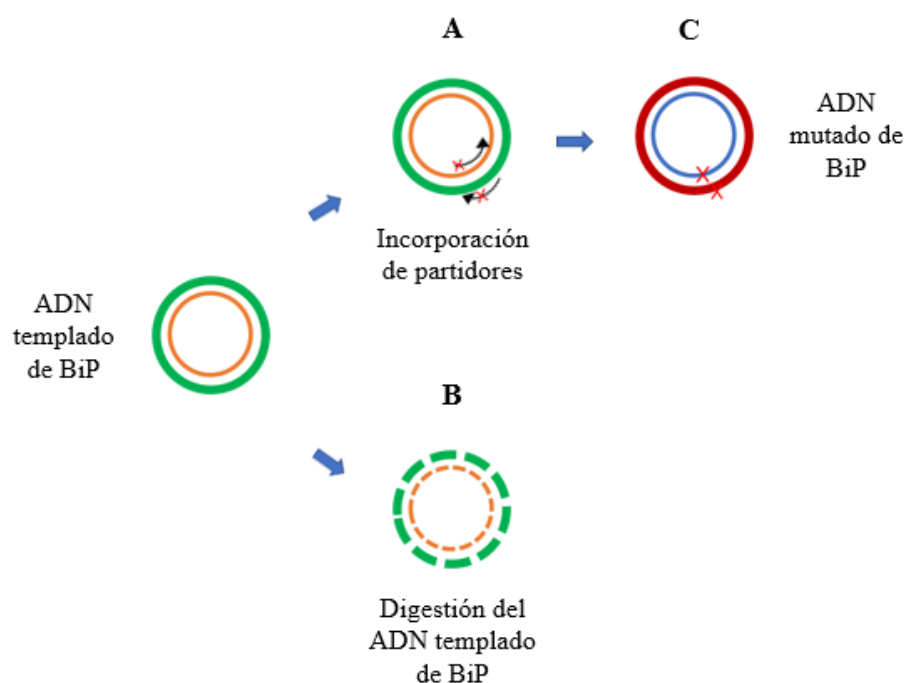
**3.2 Instrumentos y equipos:** Agitadora incubadora WiseCube WIS-30, Bomba peristáltica Ismatec MV pumpsystem, Cámara electroforética Bio-Rad Mini-PROTEAN, Centrifuga Sorvall RC-5B, Columna HisTrap™ High Performance 1 mL, Dicroismo Circular modelo Jasco J-1500, Espectrofotómetro JENWAY 635001 6305 UV/Visible, Espectrofotómetro Spectroquant® UV/VIS Pharo 300 Merck, Espectrofotómetro Nanoquant Infinite M200PRO TECAN, Programa de procesamiento de imágenes ImageJ, QIAGEN QIAprep® Spin Miniprep Kit (250), QuikChange® II XL SiteDirected Mutagenesis Kit, Sonicador Sonic Ruptor 250, Termociclador Applied Biosystems™ 2720 ThermalCycler,.

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Diseño experimental para la generación de la mutante P193G mediante mutación sitio dirigida de BiP utilizando su ADN nativo

La secuencia nucleotídica correspondiente a BiP nativa con cola de Histidinas en el extremo N-terminal, gentilmente proporcionada por el Dr. Jeffrey Brodsky (Pittsburgh University). Para generar la BiP mutante es necesario realizar una modificación un residuo de prolina por una glicina ubicada en la posición 193 del SBD. El diseño de los partidores mutagénicos se realizó mediante herramientas bioinformáticas como lo es el *Protein Data Bank* (PDB), donde se obtiene la secuencia aminoacídica tanto de DnaK y BiP. Posteriormente, se utiliza herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ver Anexo 1 y Anexo 2), donde se traduce la secuencia anterior mencionada en la secuencia nucleotídica para realizar alineamiento de estas y así encontrar el codón que se traduce al aminoácido en BiP equivalente a la prolina 143 de DnaK. A través de la preferencia codogénica de *E. coli*, muestra que el codón GGC presenta mayor probabilidad de codificar para Glicina [21], por esta razón se utiliza este codón para diseñar los partidores que generen el cambio de Prolina por Glicina en la posición 193 de BiP. Una vez encontrada la información antes mencionada, el experimento de mutación se realiza con el kit de mutagénesis sitio dirigida *QuikChange*

II, el cual es ampliamente utilizado para hacer mutaciones puntuales y reemplazar aminoácidos de interés. Este kit utiliza un vector de ADN de doble hebra (dsADN) superenrollado con el inserto para la mutación deseada y los dos partidores sintéticos diseñados para generar nuestra mutación de interés. Además, se utiliza una ADN polimerasa de alta fidelidad para una correcta replicación dirigida a los partidores mutagénicos antes mencionados. Los partidores oligonucleótidos, cada uno complementario a las hebras opuestas del vector, se extienden durante los ciclos de temperatura por la ADN polimerasa mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Extensión de los partidores generan el plásmido mutado que contiene cortes escalonados. Después del ciclo de temperatura, el producto es tratado con la enzima de restricción *Dpn* I, el cual es específico para ADN metilado o hemimetilado, el cual se usa para la digestión del ADN molde parental y para seleccionar el ADN sintetizado que contiene la mutación de interés (**Fig. 4**) [22].



**Fig. 4** Mutación sitio dirigida utilizando ADN nativo de BiP mediante PCR. **A)** Desnaturalización del ADN molde de BiP (en naranja y verde) y alineamiento, extensión e incorporación de los partidores mutagénicos (flechas en negro) que contienen la mutación deseada (cruces en rojo). **B)** Digestión del ADN de BiP molde metilado y hemimetilado mediante la acción de *Dpn* I (línea entrecortada). **C)** ADN de BiP mutado mediante mutación sitio dirigida (en azul y burdeo).

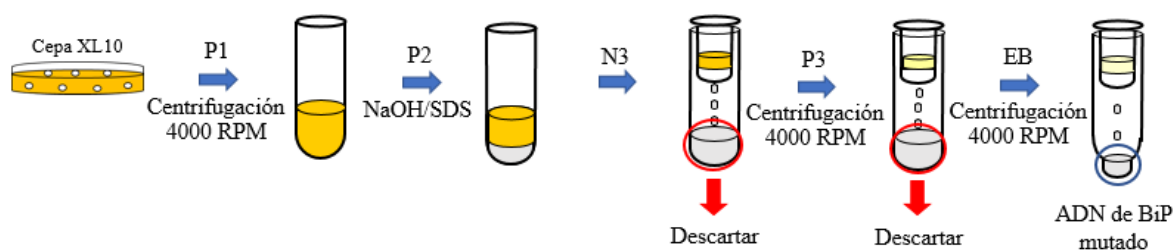
### 3.3.2 Transformación de bacterias competentes con el plásmido mutado

El vector de ADN cortado que contiene la mutación de interés es posteriormente transformado en bacterias quimiocompetentes de cepa XL10, las cuales ingresan el ADN mutado para la correcta ligación del vector y multiplicar el número de copias de este. Se agregan 100 ng de ADN plasmidial en 50  $\mu$ L de bacterias competentes, las cuales se encuentran en hielo, y se les aplica un golpe de temperatura a 42 °C por 45 segundos en una placa calefactora. Posteriormente, las muestras se dejan en hielo, se les añade 500  $\mu$ L de caldo Luria (medio LB) y, para permitir la recuperación de las bacterias XL10, se dejan en una incubadora agitadora a 37 °C y 220 RPM por 30 minutos. Una vez pasado el tiempo, se toman 250  $\mu$ L de las bacterias recuperadas y se dejan crecer durante toda la noche a 37 °C en placas de LB-Agar-Ampicilina (LB: 10 g de bacto peptona, 5 g de extracto de levadura, 16 g NaCl, 15 g de agar, Ampicilina 1000X, concentración stock 100 mg/mL para 1 L), para evitar contaminación con otros organismos. Al siguiente día, se pican las colonias que crecieron en la placa y se agregan en 10 mL de medio LB los cuales se dejan en incubadora agitadora a 37° C y 220 RPM toda la noche nuevamente [18].

### 3.3.3 Extracción de DNA mutado

Finalmente, para extraer el ADN mutado, se decantan las bacterias competentes por centrifugación en un rotor CR-68 a 4000 RPM por 15 minutos y se elimina el sobrenadante. Se vuelve a suspender el precipitado en 250  $\mu$ L de solución tampón de re-suspensión (tampón P1 en el kit) y agregar ARNasa A, la cual cataliza la hidrólisis de ARN y su degradación. Después se agregan 250  $\mu$ L de solución tampón de lisis (tampón P2 en el kit), el cual genera la lisis bacteriana en condiciones alcalinas por la presencia de hidróxido de sodio y dodecilsulfato sódico (NaOH/SDS). Luego se agregan 350  $\mu$ L de solución tampón para la precipitación (tampón N3 en el kit), el cual neutraliza el pH alcalino y genera la precipitación de proteínas denaturadas, ADN cromosomal, restos de membranas celulares y el SDS, mientras nuestro ADN plasmidial de interés es renaturalizado y queda en solución debido a que la última solución tampón posee una alta concentración de sales. Se centrifuga la muestra para separar el precipitado del sobrenadante, donde esta nuestro ADN mutado, por 30 minutos a 10 °C. En seguida, se toman 800  $\mu$ L del sobrenadante y se agregan a las columnas *QIAprep 2.0* [23], las cuales contienen una membrana de sílice para la adsorción selectiva de

ADN plasmídico en tampón con alto contenido de sal. Posteriormente, se centrifuga la columna cargada a 4000 RPM en un rotor CR-68 por 1 minuto, esto asegura de que el ARN, las proteínas celulares y los metabolitos sean eluidos de la columna por centrifugación. Se somete a un lavado la columna que tiene nuestra muestra de interés con 750  $\mu$ L solución tampón de lavado (tampón PE en el kit) y, luego de 5 minutos de espera, se centrifuga en las mismas condiciones antes mencionadas. Como última etapa, se agregan 50  $\mu$ L de solución tampón de lavado con baja concentración de sales (tampón EB en el kit) y, luego de 1 minuto de incubación, se centrifuga en las mismas condiciones descritas anteriormente para obtener nuestro ADN mutante de BiP. Una vez obtenido el ADN mutagénico, este se envía a secuenciar a una empresa externa para verificar si la mutación deseada se encuentra en la secuencia nucleotídica (**Fig. 5**).

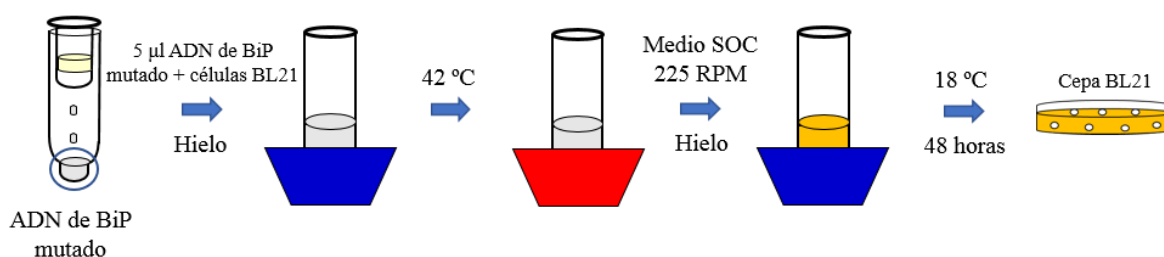


**Fig. 5 Extracción de ADN mutado de BiP desde la cepa XL10.** Se obtiene ADN con nuestra mutación deseada mediante la eliminación del sobrenadante de las células XL10 (4000 RPM por 15 minutos, rotor CR-68) y adición de ARNasa (P1), generar la lisis de la bacteria con NaOH/SDS (P2), regular el pH, precipitar restos de membranas celulares y el SDS, además de renaturalizar el ADN mutado de BiP (N3), lavado del ADN retenido en la columna QIAprep 2.0 (P3) y final elución de nuestro de ADN de interés desde la columna a 4000 RPM en un rotor CR-68 por 1 minuto (EB).

### 3.3.4 Transformación de ADN

El último procedimiento es ocupar el ADN mutante para obtener la proteína con el aminoácido mutado, esto es posible gracias a la cepa de células competentes BL21, la cual permite expresar nuestra proteína de interés. Se mezclan 50  $\mu$ L de la solución que contiene las células BL21 en frío con 5  $\mu$ L del ADN mutado, esta mezcla es necesaria incubarla por 30 minutos en hielo. Pasado el tiempo se somete la mezcla a un golpe de calor en un baño térmico a 42  $^{\circ}$ C por 30 segundos, seguido de otros 2 minutos de incubación en hielo, ya que es necesaria la perforación de la bacteria para permitir la introducción de ADN exógeno

dentro de la célula. Para sobrevivir a este proceso, las células competentes necesitan del medio SOC (del inglés *Super Optimal broth with Catabolite repression*), el cual es un medio rico en nutrientes para la preparación y transformación de células competentes [24]. Se agrega 250  $\mu$ L de medio a temperatura ambiente a la mezcla anterior en hielo y se deja en agitación a 225 RPM por 1 hora a 37  $^{\circ}$ C. Una vez pasado el tiempo, las células BL21 se cultivan en placas de LB-Agar-Ampicilina durante 48 horas a 18  $^{\circ}$ C [25]. En consecuencia, se observa el crecimiento de las colonias las cuales sobre expresaran nuestra proteína mutante de BiP a partir del ADN mutante generado anteriormente (**Fig. 6**).



**Fig. 6** Proceso de transformación de cepa de *E. coli* BL21 con ADN de BiP mutante. Procedimiento mediante shock térmico, donde la membrana celular de la cepa BL21 se desnaturaliza en calor y renaturaliza en frío para el ingreso del ADN mutante de BiP, necesario para su transcripción a proteína.

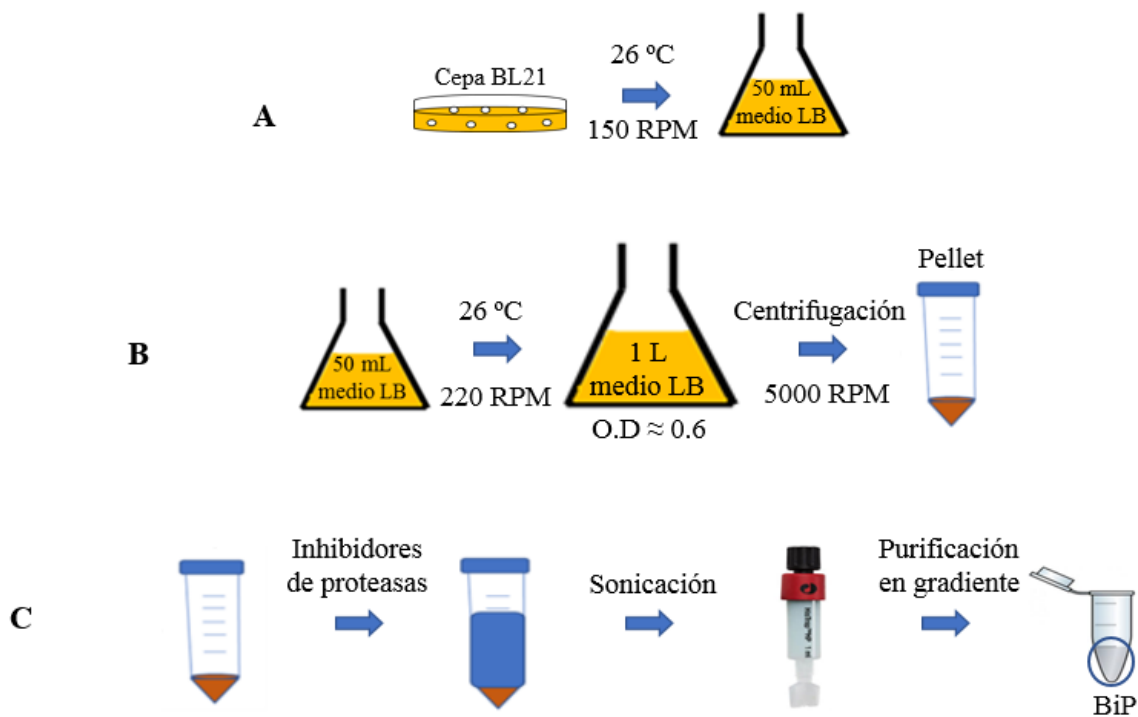
### 3.3.5 Pasos de la purificación de la proteína BiP nativa y su mutante P193G

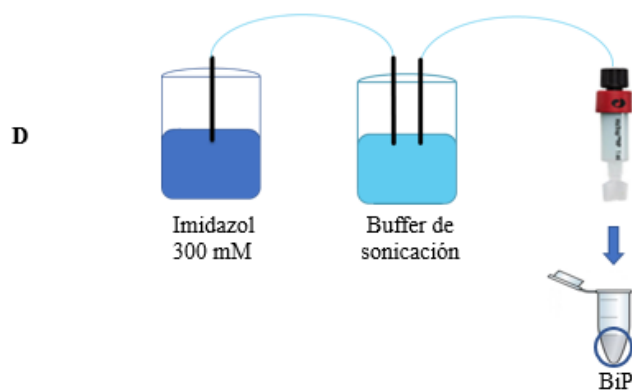
Una vez transformada la cepa BL21 para la BiP nativa y su mutante, el procedimiento de purificación será similar para ambas. Comienza al picar las colonias desde las placas LB-Agar-Ampicilina y sembrar en 50 mL de medio LB en presencia de ampicilina (1000X, concentración stock 100 mg/mL), para evitar contaminación con otros organismos, en una incubadora agitadora a 150 RPM y 26  $^{\circ}$ C (**Fig. 7A**).

Al día siguiente se trasvasijan en 1 litro de medio LB y se vuelve a dejar en el agitador a 230 RPM con las mismas condiciones de temperatura y ampicilina hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.5 (~ 6 horas). Una vez que se obtiene, se induce la sobreexpresión de proteínas con 0.5 mM de IPTG, el cual actúa como análogo molecular de la allolactosa, el cual elimina un represor del operón *lac* para inducir la expresión génica [26]. Posterior a la inducción, continua por otras 6 horas la incubación, a 26 $^{\circ}$ C y 230 RPM. Por consiguiente, las células incubadas son sometidas a centrifugación (Rotor GSA, 5 minutos, 5.000 RPM) para



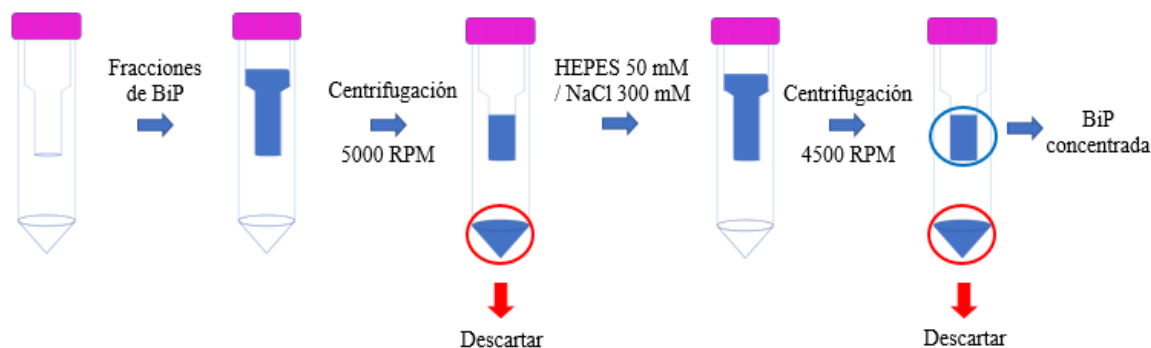
ser separadas del medio LB donde se expresaban, se lava con agua, se vuelve a centrifugar para formar un *pellet* de bacterias (**Fig. 7B**). Esta se re suspende en 30 mL de solución tampón de sonicación (NaCl 300 mM, HEPES 50 mM pH 7.4, Imidazol 50 mM y DTT 2 mM). Una vez re suspendido el extracto crudo en tampón de sonicación se deja en hielo, los inhibidores de proteasas son agregados (40 mM PMSF, 10mM Leupeptina y 8 mM Pepstatina) y las células son sonicadas (ajuste 30% *power* 50% *off*) durante 12 minutos. En los siguientes pasos todas las soluciones de lavado y las células sonicadas se mantienen en hielo para evitar la desnaturalización por temperatura de la proteína de interés. Posterior a la sonicación, las células son centrifugadas a 12.000 RPM por 15 minutos un rotor SS-34 y el sobrenadante que se obtiene se carga en una columna pre-empaquetada con Níquel, previamente equilibrada con 10 mL de buffer de sonicación. Después se cargan los siguientes lavados en la columna: lavado 1: 20 mL de solución tampón de sonicación; lavado 2: 15 mL de solución tampón de sonicación + 5 mM ATP (**Fig. 7C**). Finalmente, BiP es eluida con 15 mL de solución tampón de sonicación + 300 mM de Imidazol, el cual desplaza a las histidinas unidas al Ni<sup>+2</sup> dentro de la columna, guardando lo eluido en fracciones de 1 ml (**Fig. 7D**) [27].





**Fig. 7 Método de sobre expresión y purificación de BiP WT y su mutante P193G.** A) Preparación de un preinoculo a partir de las colonias de BL21 en 50 mL de medio LB. B) Sobre expresión de las BL21 en 1 litro de medio LB y posterior centrifugación para la obtención de un pellet de BL21. C) Homogenización del pellet, adición de inhibidores de proteasas, sonicación y posterior purificación para la obtención de fracciones de BiP. D) Método de elución en gradiente de Imidazol y purificación por columna preempaquetada con Níquel de BiP WT y BiP P193G.

Se toman muestras de las fracciones eluidas que contienen BiP en una placa de 96 pocillos a la cuales se les somete a método de Bradford cualitativo para analizar la presencia de BiP en estas. Además, se realiza una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) [28] para analizar la pureza de BiP en las fracciones eluidas anteriormente. Una vez realizado el SDS-PAGE, se toman las fracciones con mayor pureza y se concentran en las unidades de filtración por centrifugación Amicon® 10K de 15 mL a 4500 x g por 1 hora [29]. Después la muestra concentrada se diluye en solución tampón de sonicación sin Imidazol (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 300 mM y DTT 2 mM) y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones anteriormente mencionadas (**Fig. 8**). El Imidazol presente en las muestras proveniente de la elusión se remueve por filtración, ya que a la concentración que se presenta al realizar la elusión afecta la medición de la concentración por método de Bradford [30], así se obtienen una muestra única y de concentración conocida de BiP, tanto la nativa como la mutante. Finalmente, se realiza un nuevo SDS-PAGE para analizar nuevamente la pureza de la muestra obtenida, esta vez utilizando el programa de análisis de imágenes ImageJ.



**Fig. 8 Concentración de fracciones de BiP en tubos Amicon® 10K.** *Las fracciones obtenidas en la purificación son concentradas mediante centrifugación (4500 x g por 1 hora), lo que lleva a la remoción del Imidazol en concentración creciente (10 mM – 300 mM) presente en el tampón de sonicación y la elución en gradiente, el cual resulta como interferente para la medición de concentración de la muestra de BiP concentrada que finalmente se obtiene.*

### 3.3.6 Ensayo de desplegamiento para analizar la presencia de ATP proveniente de la purificación.

Con el fin de analizar sí la muestra purificada de BiP, tanto la proteína nativa como la mutante P193G, presenta cantidades de ATP provenientes de los lavados de la purificación que puedan generar una subestimación en la concentración para los experimentos de actividad enzimática de BiP, que más adelante se explicarán. Para ello, se realiza un ensayo de desplegamiento para analizar la presencia del nucleótido mediante espectrofotometría. Para el experimento 20  $\mu\text{M}$  BiP se tratan con HEPES 50 mM pH 7.4 y NaCl 300 mM y Cloruro de Guanidinio 6M 2 horas antes de la medición. Posteriormente la muestra se carga a los tubos Amicon® 10K de 500  $\mu\text{L}$  y se centrifuga a 14000 x g por 30 minutos [31]. A la solución filtrada, separada de la proteína desplegada, se le realiza un barrido espectral (210 a 320 nm) para ver el pico de absorción a 260 nm [32], con el fin de notar la presencia del ATP (coeficiente de extinción molar =  $15,4e^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y cuantificar su cantidad.

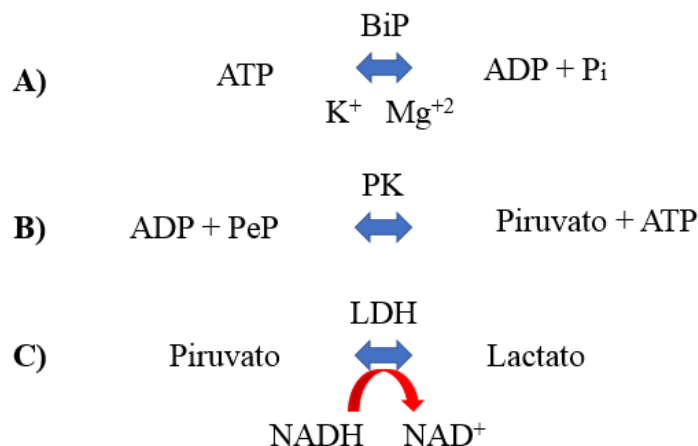
### 3.3.7 Análisis estructural mediante Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular es una técnica que entrega información sobre estructura secundaria de proteínas utilizando luz polarizada hacia la derecha y a la izquierda. Esta medición espectroscópica de dicroísmo circular se medirá en la parte lejana del espectro ultravioleta, desde 210 a 260 nm en un equipo de dicroísmo circular modelo Jasco J-1500. Donde las muestras se preparan con 3  $\mu\text{M}$  de BiP o su mutante, diluidas en HEPES 50 mM pH 7.4, KCl 125 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM y DTT 0.1 mM en una cubeta que tiene 1 mm de paso óptico.

La finalidad de estos experimentos es realizar una comparación entre BiP nativa y la mutante P193G, para así dilucidar el real efecto que pueda tener mutación sitio dirigida antes mencionada en la estabilidad estructural de la proteína BiP [33].

### 3.3.8 Caracterización enzimática de BiP y su mutante mediante un ensayo acoplado a enzimas auxiliares

A ambas proteínas se les determinará su respectiva actividad enzimática midiendo el cambio de absorbancia que se genera debido a la oxidación de NADH a  $\text{NAD}^+$ , a este cambio se le puede hacer seguimiento mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm [34][35]. Para la caracterización cinética de BiP WT y su mutante, la medición tiene una duración de 4 horas, las condiciones del experimento se mantienen a una temperatura de 37  $^{\circ}\text{C}$ , con un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . Este experimento consiste en 3 reacciones en serie llevadas a cabo por la actividad catalítica de BiP, es decir, hidrólisis de ATP en ADP y Pi (**Fig. 9A**), además de estar acopladas a enzimas auxiliares como la Piruvato Kinasa y la Lactato Deshidrogenasa en concentraciones no saturantes, las cuales a partir de ADP vuelven a generar ATP (**Fig. 9B**), para que tanto las enzimas auxiliares como el ATP no sean los reactivos limitante de la reacción acoplada, y que finalmente producen el cambio en el estado de oxidación del NADH, como se muestra en el siguiente esquema.



**Fig. 9 Esquema de la medición catalítica de BiP acoplado a enzimas auxiliares.** A) Hidrolisis de ATP en ADP por la proteína BiP. B) Recuperación de ATP y generación de Piruvato a partir de la acción de la enzima PK en presencia del ADP anteriormente formado y PeP. C) Oxidación del cofactor NADH en NAD<sup>+</sup> por acción de LDH, la cual forma Lactato a partir de Piruvato.

Para distinguir el rol de la mutación en la actividad catalítica de BiP, el experimento antes mencionado se realizará con concentraciones crecientes de ATP (0.05  $\mu\text{M}$ -2 mM) en presencia y ausencia de un heptapéptido derivado de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (HTFPAVL), el cual actúa como sustrato de BiP. Este péptido acelera la actividad ATPasa de BiP, además se ha demostrado tener valores de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  para la unión con BiP similares al sustrato original [36]. El seguimiento espectrofotométrico se realiza en presencia de 20  $\mu\text{M}$  BiP, 125 mM KCl, 50 mM HEPES pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 600  $\mu\text{M}$  PeP, 300  $\mu\text{M}$  NADH, 100  $\mu\text{M}$  de Heptapeptido, PK 2 U. I. y LDH 2 U. I La actividad catalítica de BiP nativa y su mutante genera NAD<sup>+</sup> a través de la reacción acoplada antes mencionada y disminución de la absorbancia de NADH en el tiempo (**Fig. 9C**). Con cada concentración de ATP se obtiene un gráfico de Absorbancia de NADH en el tiempo, la ecuación de la recta que entregan estas mediciones se les aplica la Ley de Lambert Beer [37] y, como la relación entre NADH:ATP es 1:1, los datos extrapolados en la ecuación obtenida se utilizan para obtener valores de concentración de ATP en el tiempo. Las pendientes de las ecuaciones de la recta antes mencionadas dan información sobre la velocidad inicial ( $V_0$ ) de la reacción enzimática de BiP, estas pendientes se grafican con las concentraciones de ATP utilizadas para obtener gráficos de la velocidad de BiP a las distintas concentraciones de ATP. Los parámetros cinéticos de afinidad ( $K_m$ ) se obtienen con las pendientes en los nuevos gráficos

descritos, la velocidad máxima de la reacción ( $V_{max}$ ) se calculan con la  $K_m$  en el tiempo total de medición y los datos de actividad enzimática se miden a través la variación de ATP en el tiempo total de medición, tanto para BiP nativa y su mutante, ajustándose en la ecuación de un clásico modelo de Michaelis-Menten [38].

**Ecuación 1** 
$$V_0 = [\text{BiP}] * [V_{max}] \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ATP}] + K_m}$$

Las variables en la **ecuación 1** corresponden a velocidad inicial ( $V_0$ ) que obtiene determinada concentración de BiP WT o BiP P193G ( $[\text{BiP}]$ ), la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) es la que se obtiene cuando BiP se satura a determinada concentración de ATP ( $[\text{ATP}]$ ) y la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) que consiste en la concentración de ATP donde se obtiene la mitad de la  $V_{max}$ .

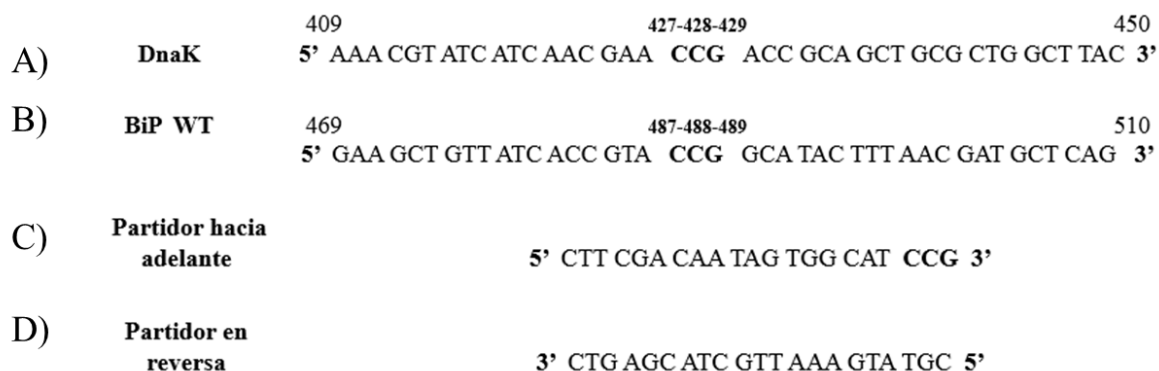
## 4. RESULTADOS

### 4.1 -Objetivo específico 1: Diseñar, obtener y purificar la proteína BiP mutada de levadura para su desacoplo alostérico.

#### 4.1.1 Diseño de partidores, obtención y secuenciación de mutación sitio dirigida de BiP WT

Se obtienen las secuencias aminoacídicas de DnaK y BiP (ver Anexo 1 y Anexo 2) con el programa bioinformático PDB. El alineamiento de secuencias de DnaK con respecto a BiP indicó que la Prolina 143 de DnaK es equivalente a la Prolina 193 de BiP. Mediante BLAST estas son traducidas a secuencias nucleotídicas. Al realizar el alineamiento, tanto la Prolina 143 de DnaK y la Prolina 193 de BiP son codificadas por el codón CCG, la ubicación del codón en el primer caso corresponde a los nucleótidos 427-428-429 y en el segundo el codón se forma con los nucleótidos 487-488-489, como se observa en la **Fig. 10A y Fig. 10B**. El diseño del partidor hacia adelante corresponde a 21 a.a de la hebra complementaria a BiP WT en dirección 5' a 3', que incluye el codón CCG, complementario a GGC que codificara para Glicina en la posición deseada para generar la mutante de BiP, y el partidor en reversa

corresponde a 21 a.a complementarios a la hebra molde en sentido 3' a 5', como indica la **Fig. 10C y Fig. 10D**.



**Fig. 10** *Secuencias nucleotídicas alineadas de DnaK y BiP WT, además de partidores diseñados para mutación sitio dirigida de BiP* A) Codón CCG que codifica para la Prolina 143 de DnaK, la ubicación corresponde a los nucleótidos 427-428-429. B) Codón CCG que codifica para la Prolina 193 de BiP WT, la ubicación corresponde los nucleótidos 487-488-489. C) Diseño del partidor hacia adelante de la hebra complementaria a BiP WT en dirección 5'a 3', incluye el codón CCG, complementario a GGC que codificara para Glicina en la posición deseada para generar la mutante de BiP D) El partidor en reversa complementarios a la hebra molde de BiP WT en sentido 3' a 5'.

Se llevó a cabo una mutagénesis de sitio dirigido por PCR con el gen de BiP WT, utilizando los partidores diseñados anteriormente explicados. Se aumentó el número de copias del ADN mutado resultante en *E. coli* XL10, luego fue purificado y se corroboró por espectrofotometría la concentración obteniendo un promedio de 73.5 ng/μL, como indica la **Tabla 1**.

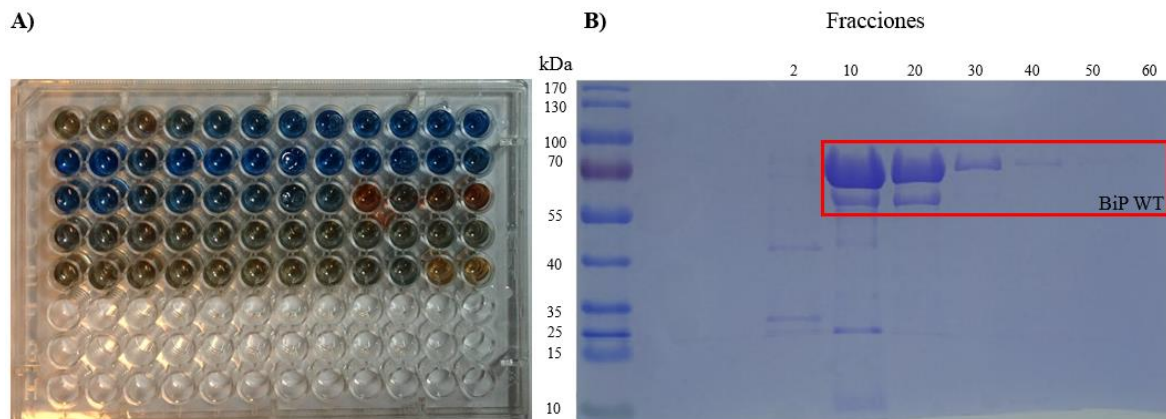
**Tabla 1.** *Medición por espectrofotometría a 260 nm de ADN de BiP P193G. La concentración del ADN total en μg/mL fue medida mediante espectrofotometría mediante equipo TECAN.*

ADN	Concentración (ng/μL)	Concentración promedio (ng/μL)
BiP P193G	Medición 1: 72,7 Medición 2: 74,2	73,5

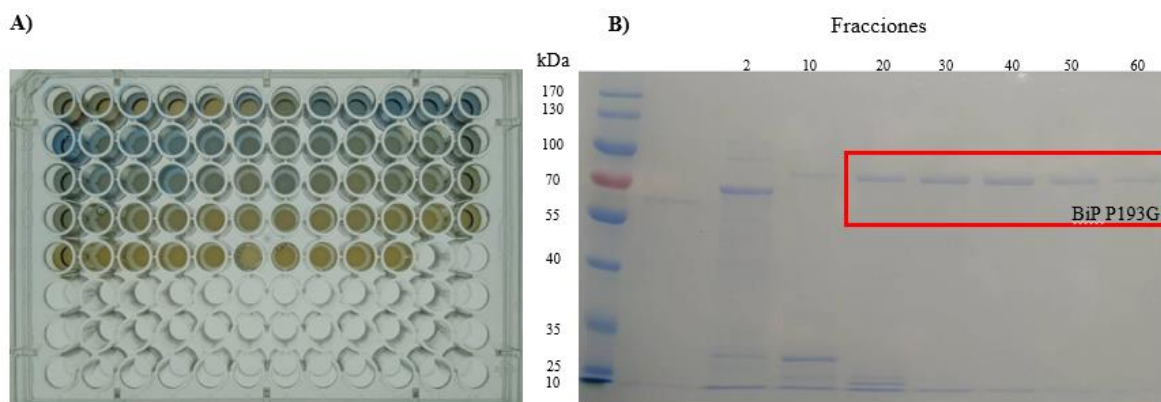
También se corroboró la mutación CCG por GGC (Pro193Gly) (preferencia codogenica,







**Fig. 2 Experimentos de detección e identificación de BiP WT.** A) Reacción de Bradford cualitativo para analizar la presencia de proteína en las fracciones obtenidas en la purificación de BiP WT. B) SDS- PAGE al 12% en condiciones denaturantes de las fracciones 2-10-20-30-40-50-60 obtenidas en la purificación de BiP WT (Masa aparente:75 kDa). Estándar de masa utilizado PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).



**Fig. 13 Experimentos de detección e identificación de BiP P193G.** A) Reacción de Bradford cualitativo para analizar la presencia de proteína en las fracciones obtenidas en la purificación de BiP P193G. B) SDS- PAGE al 12% en condiciones denaturantes de las fracciones 2-10-20-30-40-50-60 obtenidas en la purificación de BiP P193G (Masa aparente:75 kDa). Estándar de masa utilizado PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

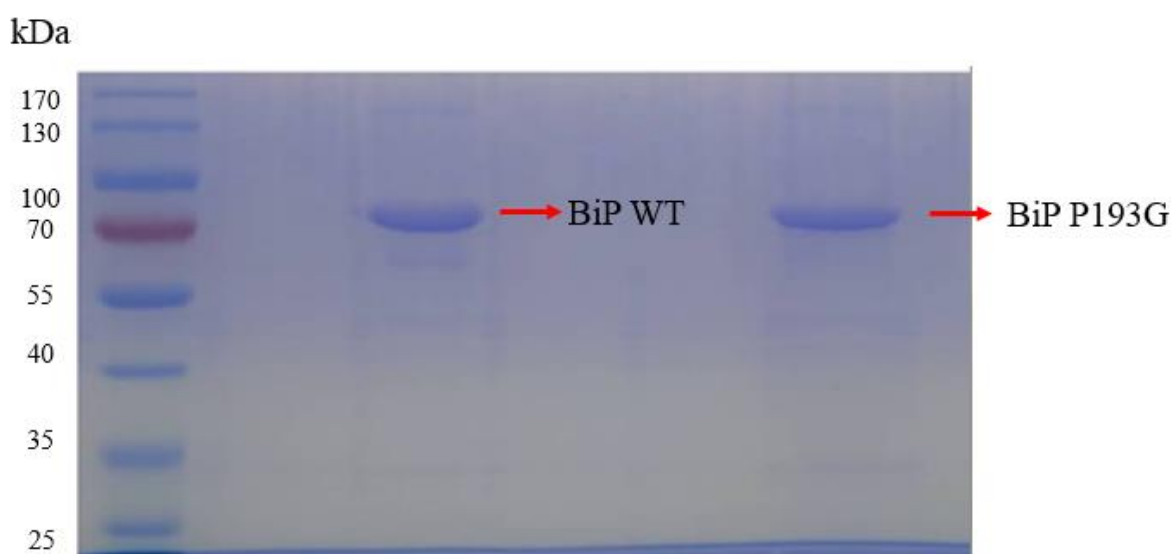
Posteriormente, se seleccionaron las fracciones sin mayores impurezas y se concentraron mediante centrifugación a 4500 x g por 1 hora en los tubos Amicon® 10K. Finalmente, la concentración obtenida mediante método de Bradford se muestra en la **Tabla 2**, donde se obtiene una concentración de 14 mg/mL para BiP WT y de 3 mg/mL para BiP P193G. Los valores de concentración final obtenida para BiP WT es de 187  $\mu$ M y BiP P193G 40  $\mu$ M, además la pureza calculada por el programa ImageJ de las muestras son 90%

respectivamente. Con la enzima nativa se obtuvo un 85% de rendimiento mayor que la mutante.

**Tabla 2. Concentración y pureza de BiP WT y BiP P193G.** La concentración de proteína total en mg/mL fue medida mediante método de Bradford. El porcentaje de pureza se midió a partir del análisis de las bandas mediante programa ImageJ. Concentraciones en  $\mu\text{M}$  fueron calculadas a partir de la masa teórica de estas mutantes (75 kDa).

Proteína	Volumen total (mL)	Concentración total de la proteína (mg/mL)	Porcentaje de pureza en el gel (%)	Concentración final ( $\mu\text{M}$ )
BiP WT	1	14	90	187
BiP P193G	0.7	3	90	40

También se realizó una nueva electroforesis con las muestras obtenidas de la concentración de las fracciones para observar la presencia de BiP (**Fig. 14**). Se puede analizar que tanto BiP WT como BiP P193G presenta una masa aparente de 75 kDa. Estos resultados indican que ambas proteínas pueden ser purificadas por columna de Níquel.



**Fig. 14 SDS- PAGE al 12% en condiciones denaturantes de las muestras concentradas de BiP WT y BiP P193G.** Muestras de BiP WT (Masa aparente: 75 kDa) y BiP P193G (Masa aparente: 75 kDa) obtenidas por filtros Amikon 10K (indicadas en flechas rojas). Muestra cargada fue 25  $\mu\text{g}$  para ambas proteínas.

### 4.1.3 Ensayo de desplegamiento para analizar la presencia de ATP proveniente de la purificación.

Con el fin de evitar sobrestimar la cantidad de ATP proveniente de la purificación de BiP nativa y su mutante que pueden afectar a las mediciones de actividad enzimática, se realizó un barrido espectral entre 210-310 nm para analizar la presencia de ATP a la longitud de onda a la que absorbe el nucleótido (260 nm). Como indica la **tabla 3**, la absorción para ATP a 260 nm fue de 0,014 para BiP WT y 0,020 para BiP P193G. Al cuantificar la cantidad de ATP mediante el método de Lambert-Beer [37], la concentración en la muestra tanto de BiP WT como de BiP mutante fue de 0,001  $\mu\text{M}$ .

*Tabla 3. Valores de absorbancia del barrido espectral para cuantificar la concentración de ATP en las muestras purificadas de BiP WT y BiP P193G.*

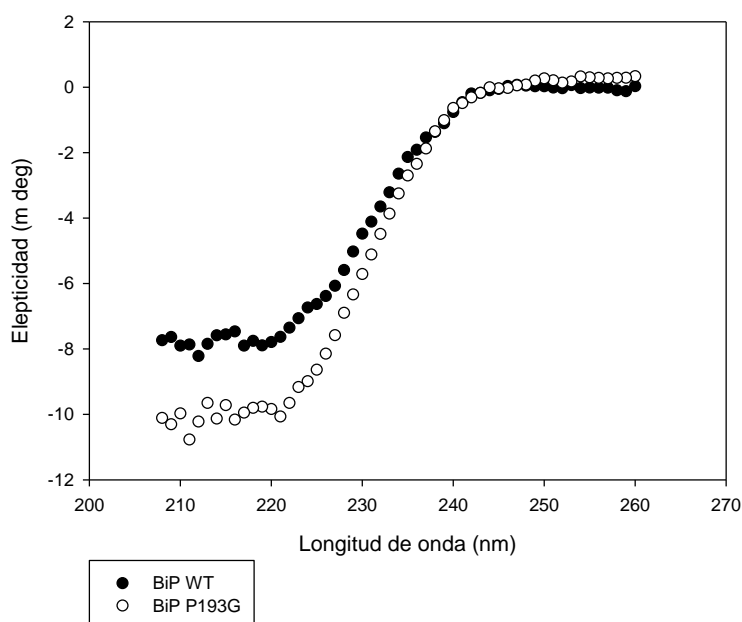
Proteína	Absorbancia de ATP	Concentración de ATP ( $\mu\text{M}$ )
BiP WT	0,014	0,001
BiP P193G	0,020	0,001

## 4.2. -Objetivo específico 2: Comparar estructuralmente BiP nativa y su mutante P193G

### 4.2.1 Comparación estructural entre BiP WT y su mutante P193G.

Para ver el efecto de la mutación puntual en la estructura de la proteína, se hizo medición espectroscópica de luz polarizada mediante dicroísmo circular en el rango ultravioleta (200-260 nm) para analizar si hay un cambio en la estructura secundaria de la proteína (hélices  $\alpha$ , hojas  $\beta$  y ovillo aleatorio). Los gráficos de dicroísmo circular cuentan con tres mínimos correspondiente a las distintas estructuras secundarias que se pueden presentar. A 215 nm corresponde a las hojas  $\beta$ , 210 y 220 nm para hélices  $\alpha$  y un mínimo a 200 nm para estructura desplegada. Se trabajó tanto BiP nativa ( $n=3$ ) como su mutante P193G ( $n=3$ ) bajo las

condiciones descritas en **3.3.6 Análisis estructural mediante Dicroísmo Circular**. Al ser analizadas por el programa Spectra Manager se aprecia dos curvas donde la señal dada por BiP P193G y la señal dada BiP nativa por como muestra la **Fig.15**. Entre las longitudes de onda de 200 y 220 nm, se observa que la similitud con un doble mínimo muy característico en los espectros de dicroísmo circular (210-220nm), lo que indica que ambas proteínas poseen una composición mayoritaria en hélices  $\alpha$  (**Fig.15**). Sin embargo, el doble mínimo se encuentra más marcado en la señal dada por BiP WT a diferencia de BiP P193G, donde la dispersión de puntos en el primer mínimo es mayor.



**Fig. 15** Espectros de dicroísmo circular para BiP WT y BiP P193G (210-220nm). Espectros que muestran la estructura seceundaria de BiP WT (●) y BiP P193G (○). La concentración de proteína utilizada fue de 2  $\mu$ M tanto para BiP WT como su mutante.

### 4.3 -Objetivo específico 3: Determinar las propiedades cinéticas de BiP nativa y su mutante alostérica P193G

#### 4.3.1 Medición de actividad enzimática de BiP y su mutante P193G.

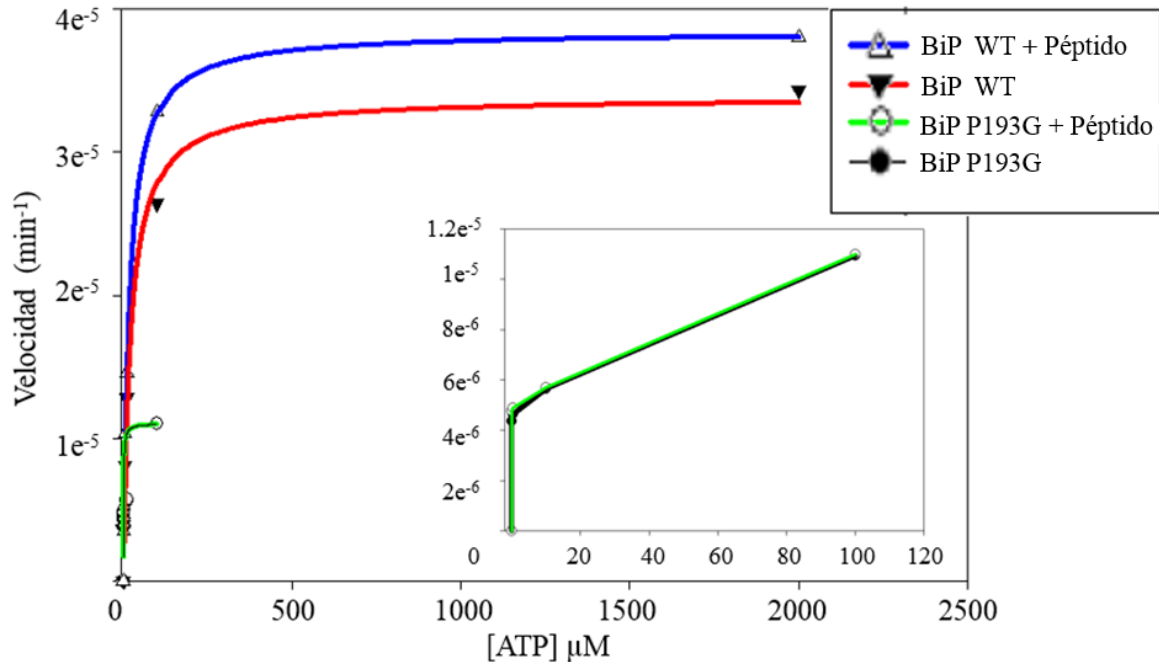
Para la caracterización cinética de BiP WT y su mutantes, bajo las condiciones descritas en **3.3.7 Caracterización enzimática de BiP y su mutante mediante un ensayo acoplado a**

**enzimas auxiliares**, se midió su actividad a distintas concentraciones de ATP como sustrato en presencia o ausencia de HTFPAVL, tanto para BiP WT como BiP P193G. Para la medición de BiP WT y P193G en presencia y ausencia del péptido a distintas concentraciones de ATP, se obtuvieron datos de absorbancia en el tiempo, donde se extraen las pendientes de cada condición que corresponden a la  $V_0$  de la reacción enzimática de BiP y mutante, como se observa en la **Tabla 4**.

**Tabla 4. Valores de pendientes de absorbancia en el tiempo para BiP WT y BIP P193G a concentraciones crecientes de ATP.** Los valores de pendientes se obtuvieron de las mediciones de Absorbancia en el tiempo para cada medición de BiP WT y BiP P193G a distintas concentraciones de ATP (0, 0.05, 0.10, 0.5, 1.00, 5.00, 10.0, 100, 2000  $\mu\text{M}$ ).

		Pendientes ( $\text{min}^{-1}$ )								
ATP ( $\mu\text{M}$ )		0	0.05	0.10	0.50	1.00	5.00	10.0	100	2000
Condición										
BiP WT	0	3.62e-6	3.69e-6	3.96e-6	4.08e-6	8.08e-6	1.28e-5	2.64e-5	3.43e-5	
BiP + Péptido	0	3.49e-6	4.01e-6	4.47e-6	5.31e-6	1.03e-5	1.46e-5	3.28e-5	3.80e-5	
BiP P163G	0	4.36e-6	-	4.64e-6	-	-	5.70e-6	1.10e-5	-	
BiP P163G + Péptido	0	4.90e-6	-	4.75e-6	-	-	5.70e-6	1.10e-5	-	

Al graficar las pendientes versus diferentes concentraciones de ATP se apreció que para cada condición la aceleración de reacción enzimática aumenta a medida que aumentan las concentraciones de ATP. Para BiP WT en presencia de péptido presentó mayor magnitud de medición que BiP WT. Por otra parte, BiP P193G en presencia de péptido mostro similar magnitud de valores obtenidos en el nuevo grafico a los datos para la proteína mutante en ausencia de HTFPAVL (**Fig. 16**).



**Fig. 16** Gráfico de actividad enzimática de BiP WT y BiP P193G a distintas concentraciones de ATP y efecto del péptido HTFPAVL. Las mediciones corresponden a BiP WT en presencia de sustrato HTFPAVL (en azul  $\Delta$ ), en ausencia de péptido (en rojo  $\blacktriangledown$ ). Las mediciones corresponden a BiP P193G en presencia del péptido (en verde  $\circ$ ) y en ausencia de péptido (en negro  $\bullet$ ). La concentración utilizada de proteína BiP en ambos casos fue de 20  $\mu\text{M}$  y del péptido HTFPAVL fue de 2  $\mu\text{M}$ .

#### 4.3.2 Efecto del péptido HTFPAVL en los parámetros cinéticos para BiP WT y su mutante P193G.

Con relación a la afinidad, los valores de  $K_m$  disminuyeron 1.3 veces en BiP nativa al entrar en presencia del péptido, lo que también se relaciona al aumento en la saturación de la enzima por su sustrato ATP debido al aumento de su actividad enzimática ( $7.7 \times 10^{-5} \mu\text{mol}/\text{min}$ ) y velocidad máxima de la reacción ( $V_{\text{max}} = 3.8 \times 10^{-5} \mu\text{mol}/\text{min}$ ) en la hidrólisis de nucleótido en ADP. En la situación de BiP P193G mostró tener actividad ATPasa de  $13 \mu\text{M}$  y al estar presencia de HTFPAVL, los valores de  $K_m$  aumentaron 3.5 veces, indicando que hay un incremento en la afinidad por ATP, pero los valores de actividad enzimática y velocidad se mantienen iguales en la tasa de hidrólisis (**Tabla 5**).

**Tabla 5. Parámetros cinéticos y efecto del péptido HTFPAVL para la proteína BiP WT y BiP P193G.** Los valores de  $K_m$  se obtuvieron con las pendientes en la curva de velocidad a distintas concentraciones de ATP (pendientes/[ATP]), la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de la reacción se calculó tomando la  $K_m$  en el tiempo total de medición ( $K_m/t_{total}$ ) y la actividad enzimática se calculó mediante la hidrólisis de ATP en el tiempo total de medición ( $\Delta ATP/t_{total}$ ).

Condición	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ ( $\mu mol/min$ )	Actividad ( $\mu mol/min$ )
BiP WT	24	$3.4e^{-5}$	$6.2e^{-5}$
BiP WT + Péptido	19	$3.8e^{-5}$	$7.7e^{-5}$
BiP P193G	13	$1.1e^{-5}$	$1.6e^{-5}$
BiP P193G + Péptido	45	$1.1e^{-5}$	$1.6e^{-5}$

## 5. DISCUSIÓN

Objetivo específico 1: Diseñar, obtener y purificar la proteína BiP mutada de levadura para su desacoplo alostérico.

Como se pudo corroborar, mediante el uso de las herramientas bioinformáticas (PDB y BLAST), además de la información proporcionada por SEQUETECH, que el diseño de la mutación sitio dirigida del ADN de BiP nativa a BiP P193G pudo ser obtenida. Las líneas celulares de *E. coli* XL10, la cual aumentó el número de copias del ADN mutado, y la cepa BL21, que generó la proteína de interés, demostraron aceptar el plásmido de interés para generar la BiP mutante y poder llevar a cabo la purificación de esta. Como ocurre en el caso de BiP WT, el método de elución en gradiente a concentraciones crecientes de Imidazol para la purificación en columna de Níquel y posterior filtración en tubos Amicon® 10K, resultaron ser efectivos para obtener ambas muestras, detectadas mediante la reacción colorimétrica de Bradford e identificadas mediante SDS-PAGE sin presencia de agregados proteicos. Los resultados del laboratorio han mostrado que la obtención de 2 bandas por SDS-PAGE en la purificación de BiP WT y P193G no afecta su cinética enzimática, mediante técnicas de identificación como la espectrometría de masas se demostró que BiP tiende a perder la “tapa” de SDB pero conserva todo su sitio de unión (dato no mostrado), lo cual no afecta mediciones de actividad enzimática.

Objetivo 2: Comparación estructural entre BiP WT y su mutante P193G.

Los gráficos obtenidos por dicroísmo circular mostraron que ambas proteínas, BiP nativa y su mutante, cuentan con una estructura secundaria definida. También, los gráficos demostraron que, al presentar la mutación puntual, BiP mutante cuenta con una mayor proporción de  $\alpha$ -hélices que hojas  $\beta$  en su estructura a diferencia de BiP WT.

Objetivo 3: Determinar las propiedades cinéticas de BiP nativa y su mutante alostérica P193G

A través de la caracterización cinética mediante el ensayo acoplado a enzimas auxiliares (PK y LDH) se logró demostrar que es posible la medición de actividad ATPasa, mediante un método espectrofotométrico con relación a la oxidación de NADH. Pese a contar con una mutación sitio dirigida, BiP P193G mostró ser activa y ser aún por el nucleótido ATP, la cual



se vio aumentada por la acción del péptido activador HTFPAVL, pero que no mostró diferencia en los valores de actividad enzimática o velocidad de la reacción. Por otra parte, BiP WT mostró ser más activa que BiP mutante, pero menos afín por ATP en la presencia del péptido activador, donde los valores de actividad mostraron un aumento en la actividad cinética, al igual que la velocidad de reacción. Esto indica que la tasa de afinidad para ATP se ve aumentada debido a la mutación de Prolina por Glicina en la posición 193, pero sin efecto directo en la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de un activador, como es el caso de HTFPAVL.

La finalidad de la mutación de Prolina por Glicina en la posición 193 de BiP es desacoplar la comunicación alostérica entre sus dominios SBD y NBD, como indica la información de DnaK [18]. Y como se observó, mientras los valores de Km aumentaron en BiP mutante en presencia del péptido HTFPAVL, eso quiere decir que aumento la afinidad por ATP, eso no llevó a que los valores de actividad enzimática o de la velocidad máxima de la reacción aumentaran, por el contrario, no tuvieron efecto en BiP P193G y fueron mucho menores que BiP WT, tanto en presencia como ausencia del activador HTFPAVL.

Con lo anterior descrito, mediante este residuo de Prolina ubicado en la posición 193, cabe la idea que pueda estar involucrado en la desregularización en el funcionamiento de BiP en el metabolismo de proteínas (translocación, plegamiento y degradación). Hay que mencionar que una vez que se genera respuesta inflamatoria, aumenta la sobreexpresión de BiP y también la respuesta de proteínas desplegadas (UPR) [39]. Como se mencionó en un principio, el aumento en la concentración de proteínas mal plegadas en el lumen del ER, es el desencadenante de distintos tipos de enfermedades crónicas [8] o la facilitación de infección por parte de virus [11][13].

Experimentos de nanorreología, donde se miden los cambios en las propiedades viscoelásticas de las proteínas, caracterizaron BiP nativa en presencia del péptido activador HTFPAVL y distintos nucleótidos como ATP y ADP, demostrando la respuesta mecánica y fuerzas del NBD y SBD en el proceso de alosterismo de BiP [17]. Por otra parte, estudios bioinformáticos han comparado BiP y DnaK al igual que este trabajo, a partir de dinámicas moleculares se ha analizado el alosterismo tomando los residuos involucrados en la unión de

distintos sustratos peptídicos en el SBD [36], dándole relevancia a las distintas aplicaciones terapéuticas de estos estudios.

Por ende, estudios de comunicación alostérica de BiP, la correlación de su ciclo catalítico y la investigación que presenta este trabajo sobre el residuo de Prolina 193 involucrado en su alosterismo se proyecta como una nueva metodología para identificar nuevos blancos terapéuticos y abordar los desencadenantes de enfermedades crónicas, neurodegenerativas e infecciones que presenta nuestra población.

## **6. CONCLUSIONES**

### **Objetivo específico 1**

El diseño, obtención y purificación la proteína BiP mutada de levadura para su desacoplo alostérico se cumple mediante el uso de herramientas bioinformáticas, uso de cepas de *E. coli* XL10 y BL21. Estas son purificadas mediante elución en gradiente a concentraciones crecientes de Imidazol, protocolo similar a la purificación de BiP nativa, indicando la reproducibilidad del método de obtención y purificación.

### **Objetivo específico 2.**

Los resultados indican que BiP nativa y su mutante P193G cuentan con una estructura determinada y con mayor proporción de hélices  $\alpha$ . Por otra parte, los espectros de dicroísmo circular indican que, posterior a la mutación sitio dirigida, BiP P193G estabiliza la formación de hélices  $\alpha$  y que BiP WT cuenta con una menor proporción de hélices  $\alpha$  lo que explicaría la diferencias que se observan en las mediciones.

### **Objetivo específico 3**

Finalmente, se logró determinar las propiedades cinéticas de BiP nativa y su mutante P193G, gracias al ensayo acoplado a partir de la oxidación de NADH con seguimiento espectrofotométrico. Este experimento demostró que BiP mutante posee afinidad por su sustrato ATP y actividad a pesar de la mutación del residuo de Prolina en posición 193, pero no se vio aumentada su actividad enzimática en presencia de HTFPAVL, a diferencia de BiP WT, la cual aumentó su actividad enzimática y velocidad de reacción.

Tomando en cuenta toda la información antes explicada, se demuestra la hipótesis propuesta que una vez mutado en la posición 193, se pierde la comunicación alostérica que regula la tasa de hidrólisis de ATP, ya que el residuo involucrado es indispensable para la comunicación inter-dominios entre el SBD y el NBD.

## **7. PROYECCIONES**

Con el fin de seguir caracterizando la regulación catalítica de BiP y los distintos procesos que eso conlleva, experimentos futuros podrían abordar la temática mostrada en este trabajo y complementarla aún más. Mediante la generación de nuevas mutantes de BiP, no solo desde el punto de vista alostérico, si no que desde la mirada de la unión a sus distintos sustratos en sus respectivos dominios y de los residuos involucrados en la hidrolisis de ATP, darían una imagen más completa en el funcionamiento de la chaperona BiP. Se mencionaron diversos estudios sobre los residuos involucrados en la unión de sustratos [18][27] y en esta investigación se utilizaron herramientas bioinformáticas para el diseño de una mutante alostérica. La extrapolación de estos mismos estudios para abordar otros procesos involucrados en la catálisis de BiP con nuevas mutantes, esto daría una idea complementaria a lo anteriormente expuesto y descrito. Por otra parte, experimentalmente se pueden recurrir a nuevas técnicas para profundizar la investigación en BiP, trabajar a nivel de moléculas individuales a través del uso de pinzas ópticas ha sido una base para explicar el funcionamiento de BiP [7]. Además, se considera el uso de otras técnicas biofísicas como la nanorreología, que utiliza cambios en la viscoelasticidad de las proteínas mediante la aplicación de fuerzas, se promete como una nueva mirada de cómo abordar el estudio de BiP [17]. Esto nos permitiría entender cómo la elasticidad de la proteína está involucrada en el alosterismo.

Desde un punto de vista farmacéutico, se encuentran en la literatura análisis bioinformáticos de fármacos antivirales ampliamente estudiados, y presentes en el mercado también, utilizando a BiP como blanco terapéutico [14]. Con el fin de complementar lo anterior descrito, hoy en día la misma investigación descrita podría aplicarse para el desarrollo de nuevos fármacos, y no solo para el tratamiento de enfermedades virales, si no para las distintas y variadas enfermedades de alto índice en la población donde BiP es parte principal, lo que muestra la suma importancia de BiP como una posible solución.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Y. Chen, Y. Zhang, and Y. Yin, “SPD - A web-based secreted protein database,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. DATABASE ISS., pp. 169–173, 2005, doi: 10.1093/nar/gki093.
- [2] J. Zhu *et al.*, “Molecular cloning, phylogenetic analysis, and expression profiling of endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP genes from bread wheat (*Triticum aestivum* L.),” *BMC Plant Biol.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–16, 2014, doi: 10.1186/s12870-014-0260-0.
- [3] A. J. Parodi, “Neuro-cognitive Mechanism of Imagining Future and Its Role in Suicide,” *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, vol. 16, no. January, pp. 483–519, 2000.
- [4] J. Behnke, M. J. Feige, and L. M. Hendershot, “BiP and Its Nucleotide Exchange Factors Grp170 and Sili1: Mechanisms of Action and Biological Functions,” *J. Mol. Biol.*, vol. 427, no. 7, pp. 1589–1608, 2015, doi: 10.1016/j.jmb.2015.02.011.
- [5] Lehninger AL; Nelson DL and Cox MM, *Lehninger principles of biochemistry*. 2005.
- [6] L. M. Hendershot, “The ER function BiP is a master regulator of ER function.,” *Mt. Sinai J. Med.*, vol. 71, no. 5, pp. 289–297, Oct. 2004.
- [7] M. P. Ramírez *et al.*, “Single molecule force spectroscopy reveals the effect of BiP chaperone on protein folding,” *Protein Sci.*, vol. 26, no. 7, pp. 1404–1412, 2017, doi: 10.1002/pro.3137.
- [8] D. N. Hebert and M. Molinari, “In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases.,” *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 4, pp. 1377–1408, 2007, doi: 10.1152/physrev.00050.2006.
- [9] H. Zheng *et al.*, “Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas.,” *Hum. Pathol.*, vol. 39, no. 7, pp. 1042–1049, 2008, doi: 10.1016/j.humpath.2007.11.009.
- [10] S. Daneshmand *et al.*, “Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival.,” *Hum. Pathol.*, vol. 38, no. 10, pp. 1547–1552, 2007, doi: 10.1016/j.humpath.2007.03.014.
- [11] P. Pyrko, A. H. Schönthal, F. M. Hofman, T. C. Chen, and A. S. Lee, “The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas.,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 20, pp. 9809–9816, 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0625.
- [12] A. Palmeira *et al.*, “Preliminary Virtual Screening Studies to Identify GRP78 Inhibitors Which May Interfere with SARS-CoV-2 Infection.,” *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 13, no. 6, 2020, doi: 10.3390/ph13060132.
- [13] J. A. Aguiar *et al.*, “Gene expression and in situ protein profiling of candidate SARS-CoV-2 receptors in human airway epithelial cells and lung tissue.,” *Eur. Respir. J.*, vol. 56, no. 3, 2020. doi: 10.1183/13993003.01123-2020.

- [14] Y. Zhang, R. A. Greer, Y. Song, H. Praveen, and Y. Song, “In silico identification of available drugs targeting cell surface BiP to disrupt SARS-CoV-2 binding and replication: Drug repurposing approach.,” *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*, vol. 160, p. 105771, 2021. doi: 10.1016/j.ejps.2021.105771.
- [15] J. Yang, M. Nune, Y. Zong, L. Zhou, and Q. Liu, “Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP,” *Structure*, vol. 23, no. 12, pp. 2191–2203, 2015, doi: 10.1016/j.str.2015.10.012.
- [16] S. M. Wilbanks and D. B. McKay, “How potassium affects the activity of the molecular chaperone Hsc70. II. Potassium binds specifically in the ATPase active site,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 5, pp. 2251–2257, 1995, doi: 10.1074/jbc.270.5.2251.
- [17] N. Casanova-Morales *et al.*, “Mechanical properties of BiP protein determined by nano-rheology,” *Protein Sci.*, vol. 27, no. 8, pp. 1418–1426, 2018, doi: 10.1002/pro.3432.
- [18] M. Vogel, B. Bukau, and M. P. Mayer, “Allosteric regulation of Hsp70 chaperones by a proline switch,” *Mol. Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 359–367, 2006, doi: 10.1016/j.molcel.2005.12.017.
- [19] M. Wisniewska *et al.*, “Crystal Structures of the ATPase Domains of Four Human Hsp70 Isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B’, and HSPA5/BiP/GRP78,” *PLoS One*, vol. 5, no. 1, p. e8625, 2010, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008625>
- [20] National Library of Medicine, “Basic Local Alignment Search Tool (BLAST),” 2023. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed Mar. 20, 2023).
- [21] BioBricks Foundation, “Escherichia coli/Codon usage,” 2012. [https://openwetware.org/wiki/Escherichia\\_coli/Codon\\_usage](https://openwetware.org/wiki/Escherichia_coli/Codon_usage) (accessed Jan. 31, 2023).
- [22] Agilent Technologies., “QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Instruction Manual, Catalog #200523 (10 reactions) and #200524 (30 reactions).,” 2015. <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/200523.pdf>
- [23] QUIAGEN, “QIAprep® Miniprep Handbook, For purification of molecular biology–grade DNA,” 2020. <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=22df6325-9579-4aa0-819c-788f73d81a09&lang=en>. (accessed Jan. 31, 2023).
- [24] C. N. E. Thermoscientific, “BL21 ( DE3 ) Competent Cells,” *User Guid.*, vol. 21, pp. 6–7, 2019.
- [25] H. Inoue, H. Nojima, and H. Okayama, “High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids.,” *Gene*, vol. 96, no. 1, pp. 23–28, 1990. doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-p.
- [26] Adriana Gallego, “¿Cómo funciona la inducción de IPTG?,” 2023. <https://goldbio.com/articles/article/unciona-induccion-IPTG#:~:text=IPTG> o

isopropil  $\beta$ -D,lactosa ingresa a las células. (accessed Apr. 04, 2023).

- [27] A. J. McClellan, J. B. Endres, J. P. Vogel, D. Palazzi, M. D. Rose, and J. L. Brodsky, "Specific molecular chaperone interactions and an ATP-dependent conformational change are required during posttranslational protein translocation into the yeast ER," *Mol. Biol. Cell*, vol. 9, no. 12, pp. 3533–3545, 1998. doi: 10.1091/mbc.9.12.3533.
- [28] S. Gallagher, "SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)," in *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, vol. 00, 2008. doi: 10.1002/9780470089941.et0703s00.
- [29] Millipore Corporation, "Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices for volumes up to 15 mL. User Guide.," 2012, [Online]. Available: <https://images-na.ssl-images-amazon.com/images/I/71A8g+u8BrL.pdf>
- [30] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, May 1976. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- [31] Millipore Corporation, "Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices for volumes up to 500  $\mu$ L. User Guide.," 2011. [https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Amicon-Ultra-0.5-Centrifugal-Filter-Unit,MM\\_NF-UFC503024#anchor\\_BRO](https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Amicon-Ultra-0.5-Centrifugal-Filter-Unit,MM_NF-UFC503024#anchor_BRO)
- [32] R. M. Bock, N.-S. Ling, S. A. Morell, and S. H. Lipton, "Ultraviolet absorption spectra of adenosine-5'-triphosphate and related 5'-ribonucleotides," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 62, no. 2, pp. 253–264, 1956. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(56\)90123-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(56)90123-0).
- [33] N. J. Greenfield, "Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 6, pp. 2876–2890, 2007, doi: 10.1038/nprot.2006.202.
- [34] C. A. M. Wilson, "Aplicación del análisis del control metabólico al estudio de la regulación de la síntesis de glicógeno in vivo en oocitos de *Caudiverbera caudiverbera* (Linneaus)," Universidad de Chile, 2008.
- [35] D. Quiroga, "Coeficientes de control para las enzimas fofoglucomutasa y glicogeno sintetasa en la via directa de sintesis de glicogeno en oocitos de *Caudiverbera caudiverbera*," Universidad de Chile, 2006.
- [36] M. Marcinowski, M. Höller, M. J. Feige, D. Baerend, D. C. Lamb, and J. Buchner, "Substrate discrimination of the chaperone BiP by autonomous and cochaperone-regulated conformational transitions," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 150–159, 2011, doi: 10.1038/nsmb.1970.
- [37] J. Clark, "The Beer-Lambert law," 2007. <https://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/beerlambert.html> (accessed Dec. 14, 2022).
- [38] K. A. Johnson and R. S. Goody, "The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper," *Biochemistry*, vol. 50, no. 39, pp. 8264–8269, 2011,

doi: 10.1021/bi201284u.

- [39] H. M. Alfaro-Valdés, F. Burgos-Bravo, N. Casanova-Morales, D. Quiroga-Roger, and C. A.M. Wilson, “Mechanical Properties of Chaperone BiP, the Master Regulator of the Endoplasmic Reticulum,” *Endoplasmic Reticulum*, 2019, doi: 10.5772/intechopen.82080.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1: Secuencia nucleotídica de DnaK.

ATGGGTAAAATAATTGGTATCGACCTGGGTACTACCAACTCTTGTGTAGCGATT  
ATGGATGGCACCCTCCTCGCGTGCTGGAGAACGCCGAAGGCGATCGCACCAC  
GCCTTCTATCATTGCCTATACCCAGGATGGTGAACTCTAGTTGGTCAGCCGGC  
TAAACGTCAGGCAGTGACGAACCCGCAAAACACTCTGTTTGGCATTAAACGCC  
TGATTGGTCGCCGCTTCCAGGACGAAGAAGTACAGCGTGATGTTTCCATCATGC  
CGTTCAAATTATTGCTGCTGATAACGGCGACGCATGGGTTCGAAGTTAAAGGC  
CAGAAAATGGCACCGCCGAGATTTCTGCTGAAGTGCTGAAAAAATGAAGAA  
AACCGCTGAAGATTACCTGGGTGAACCGGTAAGCTGTTATCACCGTAC  
CGGCATACTTTAACGATGCTCAGCGTCAGGCAACCAAAGACGCAGGCCGTATC  
GCTGGTCTGGAAGTAAACGTATCATCAACGAACCGACCGCAGCTGCGCTGGC  
TTACGGTCTGGACAAAGGCACTGGCAACCGTACTATCGCGGTTTATGACCTGG  
GTGGTGGTACTTTCGATATTTCTATTATCGAAATCGACGAAGTTGACGGCGAAA  
AAACCTTCGAAGTTCTGGCAACCAACGGTGATACCCACCTGGGGGGTGAAGAC  
TTCGACAGCCGTCTGATCAACTATCTGGTTGAAGAATTCAAGAAAGATCAGGG  
CATTGACCTGCGCAACGATCCGCTGGCAATGCAGCGCCTGAAAGAAGCGGCAG  
AAAAAGCGAAAATCGAACTGTCTTCCGCTCAGCAGACCGACGTAAACCTGCCA  
TACATCACTGCAGACGCGACCGGTCCGAAACACATGAACATCAAAGTGACTCG  
TGCGAAACTGGAAAGCCTGGTTGAAGATCTGGTAAACCGTTCCATTGAGCCGC  
TGAAAGTTGCACTGCAGGACGCTGGCCTGTCCGTATCTGATATCGACGACGTTA  
TCCTCGTTGGTGGTCAGACTCGTATGCCAATGGTTCAGAAGAAAGTTGCTGAGT  
TCTTTGGTAAAGAGCCGCGTAAAGACGTAAACCCGGACGAAGCTGTAGCAATC  
GGTGCTGCTGTTCAGGGTGGTGTCTGACTGGTGACGTAAAAGACGTACTGCTG  
CTGGACGTTACCCCGCTGTCTCTGGGTATCGAAACCATGGGCGGTGTGATGACC  
ACGCTGATCGCGAAAAACCACTATCCCGACCAAGCACAGCCAGGTGTTCTC  
TACCGCTGAAGACAACCAGTCTGCGGTAACCATCCATGTGCTGCAGGGTGAAC  
GTAAACGTGCGGCTGATAACAAATCTCTGGGTCAGTTCAACCTAGATGGTATC  
AACCCGGCACCGCGCGGCATGCCGCAGATCGAAGTTACCTTCGATATCGATGC  
TGACGGTATCCTGCACGTTTCCGCGAAAGATAAAAACAGCGGTAAAGAGCAGA



AGATCACCATCAAGGCTTCTTCTGGTCTGAACGAAGATGAAATCCAGAAAATG  
GTACGCGACGCAGAAGCTAACGCCGAAGCTGACCGTAAGTTTGAAGAGCTGGT  
ACAGACTCGCAACCAGGGCGACCATCTGCTGCACAGCACCCGTAAGCAGGTTG  
AAGAAGCAGGCGACAAACTGCCGGCTGACGACAAAAGCTGCTATCGAGTCTGCG  
CTGACTGCACTGGAAACTGCTCTGAAAGGTGAAGACAAAGCCGCTATCGAAGC  
GAAAATGCAGGAACTGGCACAGGTTTCCCAGAAACTGATGGAAATCGCCCAGC  
AGCAACATGCCCAGCAGCAGACTGCCGGTGCTGATGCTTCTGCAAACAACGCG  
AAAGATGACGATGTTGTCGACGCTGAATTTGAAGAAGTCAAAGACAAAAATA  
A

**Anexo 2: Secuencia nucleotídica de BiP.**

ATGTTTTTCAACAGACTAAGCGCTGGCAAGCTGCTGGTACCACTCTCCGTGGTCCTGTA  
CGCCCTTTTCGTGGTAATATTACCTTTACAGAATTCTTTCCACTCCTCCAATGTTTTAGT  
TAGAGGTGCCGATGATGTAGAAAACACTACGGAAGTGTATCGGTATTGACTTAGGTACT  
ACTTATTCCTGTGTTGCTGTGATGAAAAATGGTAAGACTGAAATTCTTGCTAATGAGCA  
AGGTAACAGAATCACCCCATCTTACGTGGCATTACCCGATGATGAAAGATTGATTGGT  
GATGCTGCAAAGAACCAAGTTGCTGCCAATCCTCAAAACACCATCTTCGACATTAAGA  
GATTGATCGGTTTGAATATAACGACAGATCTGTTTCAGAAGGATATCAAGCACTTGCC  
ATTTAATGTGGTTAATAAAGATGGGAAGCCCGCTGTAGAAGTAAGTGTCAAAGGAGAA  
AAGAAGTTTTTTACTCCAGAAGAAATTTCTGGTATGATCTTGGGTAAGATGAAACAAA  
TTGCCGAAGATTATTTAGGCACTAAGGTTACCCATGCTGTCGTTACTGTTCTGCTTATT  
TCAATGACGCGCAAAGACAAGCCACCAAGGATGCTGGTACCATCGCTGGTTTGAACGT  
TTTGAGAATTGTTAATGAACCAACCGCAGCCGCCATTGCCTACGGTTTGGATAAATCTG  
ATAAGGAACATCAAATTATTGTTTATGATTTGGGTGGTGGTACTTTCGATGTCTCTCTAT  
TGTCTATTGAAAACGGTGTTTTTCGAAGTCCAAGCCACTTCTGGTGATACTCATTAGGT  
GGTGAAGATTTTACTATAAGATCGTTCGTCAATTGATAAAAGCTTTCAAGAAGAAGC  
ATGGTATTGATGTGTCTGACAACAACAAGGCCCTAGCTAAATTGAAGAGAGAAGCTGA  
AAAGGCTAAACGTGCCTTGTCCAGCCAAATGTCCACCCGATTGAAATTGACTCCTTCG  
TTGATGGTATCGACTTAAGTGAACCTTGACCAGAGCTAAGTTTGAGGAATTAACCT  
AGATCTATTCAAGAAGACCTTGAAGCCTGTCGAGAAGGTTTTGCAAGATTCTGGTTTGG  
AAAAGAAGGATGTTGATGATATCGTTTTGGTTGGTGGTCTACTAGAATTCCAAGGTC  
CAACAATTGTTAGAAATCATACTTTGATGGTAAGAAGGCCTCCAAGGGTATTAACCCAG

ATGAAGCTGTTGCATACGGTGCAGCCGTTCAAGCTGGTGTCTTATCCGGTGAAGAAGG  
TGTCGAAGATATTGTTTTATTGGATGTCAACGCTTTGACTCTTGGTATTGAAACCACTG  
GTGGTGTGACTCCATTAATTAAGAGAAATACTGCTATTCCCTACAAAGAAATCCCAA  
ATTTTCTCTACTGCCGTTGACAACCAACCAACCGTTATGATCAAGGTATACGAGGGTGA  
AAGAGCCATGTCTAAGGACAACAATCTATTAGGTAAGTTTGAATTAACCGGCATTCCA  
CCAGCACCAAGAGGTGTACCTCAAATTGAAGTCACATTTGCACTTGACGCTAATGGTAT  
TCTGAAGGTGTCTGCCACAGATAAGGGAACTGGTAAATCCGAATCTATCACCATCACT  
AACGATAAAGGTAGATTAACCCAAGAAGAGATTGATAGAATGGTTGAAGAGGCTGAA  
AAATTCGCTTCTGAAGACGCTTCTATCAAGGCCAAGGTTGAATCTAGAAACAAATTAG  
AAAACCTACGCTCACTCTTTGAAAAACCAAGTTAATGGTGACCTAGGTGAAAAATTGGA  
AGAAGAAGACAAGGAAACCTTATTAGATGCTGCTAACGATGTTTTAGAATGGTTAGAT  
GATAACTTTGAAACCGCCATTGCTGAAGACTTTGATGAAAAGTTCGAATCTTTGTCCAA  
GGTCGCTTATCCAATTACTTCTAAGTTGTACGGAGGTGCTGATGGTTCTGGTGCCGCTG  
ATTATGACGACGAAGATGAAGATGACGATGGTGATTATTTCGAACACGACGAATTGTA  
G