

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**«Explorando la interacción entre el péptido señal de translocación reticular y el translocón Sec61 mediante espectroscopía de fuerza a nivel de molécula individual»**

**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:**

***Luka Ariel Robeson Rodríguez***

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

**Codirector de tesis: Dra. Nathalie V. Casanova Morales**

**Santiago de Chile, julio 2020**

**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**

**LUKA ARIEL ROBESON RODRIGUEZ**

**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 Bioquímico, en el examen público rendido el día**

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Christian A. M. Wilson Moya** \_\_\_\_\_

**Codirector de Tesis:**

**Dra. Nathalie V. Casanova Morales** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Hernán E. Lara Peñaloza** \_\_\_\_\_

**Dra. Claudia A. Metz Baer** \_\_\_\_\_

**Dr. Germán R. Günther Sapunar** \_\_\_\_\_

LUGAR DE DESARROLLO DE LA TESIS:

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

Departamento de Ciencias, 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.**

**Beca de Facultad** magíster, 2018-2020.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores, el Dr. Christian A. M. Wilson y la Dra. Nathalie Casanova Morales. En el período de gran incertidumbre que han sido el final del año 2019 y todo lo que va de 2020, no podría haber pedido un mejor equipo para guiarme y sacar adelante este proyecto. Sus consejos y nuestras discusiones intelectuales me llevaron a apreciar en profundidad todo el trabajo que he realizado, mientras que su incondicional apoyo emocional me empujó a mi máximo potencial. Espero de todo corazón que sigamos colaborando en el futuro, esta vez como colegas profesionales, y seguir aprendiendo y ampliando mi visión gracias a ustedes.

También deseo agradecer a las instituciones que hicieron posible este proyecto. CONICYT (ahora ANID), cuyo proyecto Fondecyt N° 1181361 brindó los recursos para llevar a cabo esta investigación, y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, por otorgarme la beca de arancel que me permitió realizar este magíster.

Agradezco a los estimados miembros de mi comisión, Dr. Hernán Lara, Dr. Germán Günther y Dra. Claudia Metz, por su apoyo, muy buena disposición y su valiosa e inspiradora crítica constructiva.

En mi camino de formación como bioquímico, he tenido la enorme fortuna de haber sido guiado casi exclusivamente por científicas chilenas de excelencia, a las que quiero destacar por su calidad humana y profesional. Quiero agradecer directamente a Dra. Camila Valenzuela Montenegro, Dra. Maira Rivera Valdés, Dra. Francesca Burgos Bravo y Mag. Hilda Alfaro Valdés. La colaboración directa de Francesca e Hilda en este proyecto fue crucial para su culminación, en todos sus pasos prácticos. Además, quiero dar las gracias al Dr. Andrés Bustamante Gatica y Mag. Rodrigo Rivera Silva, miembros del laboratorio del Dr. Mauricio Báez Larach durante el transcurso de esta tesis, por su ayuda con la purificación de proteínas y el manejo de pinzas ópticas. Agradezco a los colaboradores internacionales Dr. Randy Schekman y Bob Lesch, y a mis compañeros de laboratorio Valentina Carrasco Grimaldi y Miguel Lagos Espinoza, por su valiosa retroalimentación.

Le doy mis gracias a todos aquellos que me apoyaron en este proceso. Muchas gracias a mi familia; a mis abuelos por su preocupación y apoyo, a mi papá por sus consejos y ánimos, y a mi mamá especialmente, por siempre estar preocupada de mí, estar pendiente de mi avance y orgullosa de mis logros. Agradezco a mis amigos, a todos ellos, a los que me apoyaron anímicamente durante toda la carrera y a los que fui conociendo mejor durante mi proceso de tesis. Finalmente, agradezco a mi pareja, Estefanía, que ha sido un tremendo pilar de apoyo emocional durante todo este tiempo, con su infinita paciencia y cariño.

**iMuchas gracias a todos!**

# ÍNDICE

<b>1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1.- VÍA SECRETORA .....	1
1.2.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL TRANSLOCÓN SEC .....	4
1.3.- PÉPTIDO SEÑAL .....	6
1.4.- MECANISMOS DE TRANSLOCACIÓN Y ROL DEL PÉPTIDO SEÑAL .....	7
1.5.- <i>PREPRO-ALPHA-FACTOR</i> COMO MODELO DE ESTUDIO DE TRANSLOCACIÓN .....	11
1.6.- ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE INTERACCIÓN A NIVEL DE MOLÉCULA INDIVIDUAL MEDIANTE PINZAS ÓPTICAS .....	12
<b>2.- HIPOTESIS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.- OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
3.1.- OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3.2.1.- <i>Diseñar, sintetizar el plásmido y purificar las mutantes de prepro-alpha-factor Tyr165Cys y Ala13Glu/Tyr165Cys funcionalizadas con cisteína para su uso en pinzas ópticas.</i> .....	15
3.2.2.- <i>A partir de las mutantes purificadas, sintetizar quimeras de proteína-ADN mediante ligación covalente a mangas de ADN biotiniladas y tioladas, para permitir la unión a las microsferas de poliestireno del sistema de pinzas ópticas.</i> .....	15
3.2.3.- <i>Obtener el translocón Sec61 purificado y funcional en detergente, para su estudio a nivel de molécula individual mediante pinzas ópticas.</i> .....	15
3.2.4.- <i>Determinar la constante cinética de disociación, la energía libre del estado de transición y la distancia del estado de transición, en la interacción entre el péptido señal de las mutantes de prepro-alpha-factor Tyr165Cys y Ala13Glu/Tyr165Cys, con el translocón Sec61, mediante espectroscopía de fuerzas por pinzas ópticas.</i> .....	15
<b>4.- MATERIALES Y METODOLOGIA .....</b>	<b>16</b>
4.1.- REACTIVOS E INSUMOS .....	16
4.2.- METODOLOGIA .....	18
4.2.1.- <i>Modelamiento de mutantes de Ppaf</i> .....	18
4.2.2.- <i>Construcción de plásmidos de mutantes de Ppaf</i> .....	19
4.2.3.- <i>Expresión y purificación de la proteína Ppaf</i> .....	19
4.2.4.- <i>Síntesis de mangas de ADN biotiniladas y tioladas</i> .....	20
4.2.5.- <i>Ligación de las mutantes de Ppaf con mangas de ADN para su uso en pinzas ópticas</i> .....	20
4.2.6.- <i>Purificación de liticasa recombinante</i> .....	22
4.2.7.- <i>Ensayo de actividad de liticasa recombinante</i> .....	23
4.2.8.- <i>Purificación del complejo Sec61</i> .....	24
4.2.9.- <i>Funcionalización de esferas de poliestireno</i> .....	28
4.2.10.- <i>Preparación de muestras para pinzas ópticas in situ</i> .....	29
4.2.11.- <i>Ensayos de interacción de molécula única mediante espectroscopía de fuerzas utilizando pinzas ópticas</i> .....	29

4.2.12.- Análisis de datos de pinzas ópticas para obtener interacciones específicas entre PpaF y Sec61 .....	31
4.2.13.- Modelo de Dudko-Hummer-Szabo y modelo de Bell.....	33
<b>5.- RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
5.1.- OBJETIVO ESPECÍFICO 1: PURIFICACIÓN DE <i>PREPRO-ALPHA-FACTOR</i> (PPAF) TYR165CYS Y ALA13GLU/TYR165CYS. ....	35
5.1.1.- Diseño y secuenciación de plásmidos de PpaF .....	35
5.1.2.- Modelamiento de mutantes de PpaF no muestra cambios aparentes en la estructura secundaria del péptido señal.....	36
5.1.3.- Purificación e identificación de mutantes de PpaF.....	38
5.2.- OBJETIVO ESPECÍFICO 2: LIGACIÓN DE <i>PREPRO-ALPHA-FACTOR</i> A MANGAS DE ADN. ....	40
5.2.1.- Síntesis de mangas de ADN .....	40
5.2.2.- Ligación covalente de PpaF-ADN.....	41
5.3.- OBJETIVO ESPECÍFICO 3: PURIFICACIÓN DE TRANSLOCÓN SEC61.....	43
5.4.- OBJETIVO ESPECÍFICO 4: ESPECTROSCOPÍA DE FUERZAS EN PINZAS ÓPTICAS. ....	46
5.4.1.- Los eventos de ruptura de la espectroscopía de fuerzas entre las mutantes de PpaF y Sec61 muestran un comportamiento elástico .....	46
5.4.2.- Análisis de datos de pinzas ópticas para obtener interacciones específicas entre PpaF y Sec61 .....	47
5.4.3.- Datos cinéticos de disociación obtenidos mediante modelos de Dudko-Hummer-Szabo y Bell.....	50
<b>6.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
<b>7.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>8.- BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. TRÁFICO A TRAVÉS DEL SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS. ....	2
FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL TRANSLOCÓN SEC61 DE LA LEVADURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> . ....	5
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA CLÁSICA DEL PÉPTIDO SEÑAL. ....	7
FIGURA 4. TRANSLOCACIÓN COTRADUCCIONAL Y POSTRADUCCIONAL DE PROTEÍNAS A TRAVÉS DEL CANAL SEC61. ....	9
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA SECUENCIA DE <i>PREPRO-ALPHA-FACTOR</i> . ....	11
FIGURA 6. PAISAJE ENERGÉTICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL SP Y EL TRANSLOCÓN SEC61. ....	14
FIGURA 7. MÉTODO DE LIGACIÓN DE PROTEÍNAS A MANGAS DE ADN. ....	21
FIGURA 8. PASOS DE PURIFICACIÓN DE TRANSLOCÓN SEC61. ....	28
FIGURA 9. DISEÑO EXPERIMENTAL DE ESPECTROSCOPÍA DE FUERZAS EN PINZAS ÓPTICAS. ....	30
FIGURA 10. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEÍNAS MF(ALPHA)1 DE <i>S. CEREVISIAE</i> Y PPAF TYR165CYS CODIFICADA EN EL PLÁSMIDO PMAH1. ....	36
FIGURA 11. COMPARACIÓN DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DE MUTANTES DE PPAF. ....	37
FIGURA 12. MODELAMIENTO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS MUTANTES DE PPAF. ....	37
FIGURA 13. SDS-PAGE AL 12% DE LOS PRODUCTOS DE PURIFICACIÓN DE PPAF. ....	38
FIGURA 14. <i>WESTERN BLOT</i> DE LAS FRACCIONES ELUIDAS EN LA PURIFICACIÓN DE PPAF SILVESTRE. ..	40
FIGURA 15. GEL DE PRODUCTOS DE SÍNTESIS DE MANGAS DE ADN. ....	41
FIGURA 16. PAGE NATIVO AL 6% DEL PRODUCTO DE LIGACIÓN DE PPAF TYR165CYS-MANGAS DE ADN. ....	42
FIGURA 17. <i>WESTERN BLOT</i> DEL ENSAYO DE TRANSLOCACIÓN DE PPAF CON MICROSOMAS DE 20 Y 8,68 MG/ML. ....	44
FIGURA 18. <i>WESTERN BLOT</i> DE LOS COMPONENTES DEL TRANSLOCÓN. ....	45
FIGURA 19. TRAZA CARACTERÍSTICA DE LA ESPECTROSCOPÍA DE FUERZAS ENTRE ESFERAS FUNCIONALIZADAS. ....	46
FIGURA 20. HISTOGRAMA DE FRECUENCIA RELATIVA DE FUERZAS DE RUPTURA DEL CONTROL NEGATIVO. ....	48
FIGURA 21. HISTOGRAMAS NORMALIZADOS DE FUERZA DE RUPTURA DE LA INTERACCIÓN SEC61 CON LAS PROTEÍNAS PPAF TYR165CYS Y ALA13GLU/TYR165CYS. ....	49
FIGURA 22. AJUSTE DE BELL EN GRÁFICOS DE FUERZA DE RUPTURA CONTRA TIEMPO DE VIDA DE LAS MUTANTES DE PPAF. ....	50
FIGURA 23. FRACCIÓN DE INTERACCIÓN DE LAS MUTANTES DE PPAF. ....	52
FIGURA 24. PAISAJE DE ENERGÍA SUGERIDO POR LOS PARÁMETROS CINÉTICOS. ....	56

## INDICE DE TABLAS

TABLA 1. <i>REACTIVOS UTILIZADOS</i> . ....	16
TABLA 2. <i>LISTADO DE ANTICUERPOS Y ANTÍGENOS UTILIZADOS PARA SU SÍNTESIS</i> . ....	18
TABLA 3. <i>CONDICIONES DE DIGESTIÓN CON LITICASA</i> ....	24
TABLA 4. <i>CONDICIONES PARA LOS ENSAYOS DE TRANSLOCACIÓN DE PPAF CON FRACCIONES MICROSOMALES OBTENIDAS</i> . ....	27
TABLA 5. <i>CONCENTRACIONES Y PUREZA DE LAS MUTANTES DE PPAF</i> . ....	39
TABLA 6. <i>PARÁMETROS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS MODELOS DHS Y BELL PARA LAS MUTANTES DE PPAF</i> . ....	51

## **ABREVIATURAS**

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosín trifosfato
BiP	Proteína de unión a inmunoglobulina
CDF	Función de distribución acumulada
Cys	Cisteína
DHS	Dudko-Hummer-Szabo
DM	Doble mutante de <i>Prepro-alpha-factor</i> Ala13Glu/Tyr165Cys
DPS	2,2'-dipiridil disulfuro
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GEV	Distribución generalizada de valores extremos
Glu	Glutamato
His	Histidina
Hsp	Proteína de shock térmico
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria Bertani
Mut-C	Mutante de <i>Prepro-alpha-factor</i> Tyr165Cys
OD	Densidad óptica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas



PDF	Función de densidad de probabilidad
PpaF	<i>Prepro-alpha-factor</i>
RCF	Fuerza centrífuga relativa
RE	Retículo endoplásmico
RECM	Raíz del error cuadrático medio
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SBTI	Inhibidor de tripsina de soja ( <i>Glycine max</i> )
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS
SE	Error estándar
SP	Péptido señal
SR	Receptor de Partícula de Reconocimiento de Señal
SRP	Partícula de Reconocimiento de Señal
TM	Transmembrana
Trip	Tripsina
Tyr	Tirosina
UC Berkeley MCB	Departamento de Biología Molecular y Celular, Universidad de California, Berkeley
UCLA	Universidad de California, Los Ángeles

## **RESUMEN**

Sec61 es un canal transportador de proteínas, conocido como translocón, que se encuentra en la membrana del retículo endoplasmático en eucariontes. Su función es permitir el paso de las proteínas desde el citosol al lumen reticular en un proceso conocido como translocación, que es el primer paso de la vía de exportación de proteínas. En humanos, alrededor de un 38% de las proteínas sintetizadas por la célula transloca al lumen reticular. Esto se debe a que poseen una secuencia de aminoácidos, en su extremo N-terminal, conocida como «péptido señal», la cual cumple un rol de reclutamiento de la proteína a la membrana del retículo y, luego, de interacción con el translocón. Esta última función representa el primer paso del proceso de translocación, por lo que es particularmente interesante de estudiar.

El péptido señal posee una secuencia poco conservada entre proteínas, sin embargo, se distinguen tres regiones comunes en todos ellos: una región N-terminal de residuos de carga positiva (región n), una región hidrofóbica en forma de hélice  $\alpha$  (región h) y una región C-terminal de residuos polares de cadena corta (región c). Se ha descrito que la región h es fundamental para el proceso de translocación, ya que las mutaciones en residuos hidrofóbicos de esta secuencia disminuyen drásticamente las tasas de translocación y secreción. La región h del péptido señal actúa mediante su inserción en una «compuerta lateral» del canal Sec61, causando un cambio conformacional que abre el poro y deja al translocón en una conformación activa.

Para estudiar el proceso de translocación, se ha utilizado como modelo la proteína *Prepro-alpha-factor* (PpaF) de *S. cerevisiae*, que fue la primera proteína descrita en presentar un mecanismo de translocación postraduccional en eucariontes. Se ha visto que la mutación puntual Ala13Glu, en la región h del péptido señal de PpaF, disminuye hasta 50 veces la tasa de translocación. Una hipótesis que explicaría este fenómeno es que la mutación Ala13Glu disminuye la energía libre del estado de transición del proceso de disociación, mientras que aumenta la constante cinética de disociación, en la interacción entre el péptido señal y el canal Sec61, en comparación a la proteína silvestre.

Se estudió esta hipótesis mediante espectroscopía de fuerzas utilizando pinzas ópticas, herramienta que permite medir la interacción entre proteínas a nivel de molécula única (*in singulo*). Como primer objetivo se preparó a la proteína PpaF y su mutante Ala13Glu para su manipulación con pinzas ópticas. Con este fin, se llevó a cabo mutagénesis de sitio dirigido por PCR para incorporar un residuo de cisteína, necesario para enlazar de manera covalente a las proteínas, en la posición 165 (mutación Tyr165Cys). Luego, se expresaron y purificaron las mutantes Tyr165Cys y Ala13Glu/Tyr165Cys, ambas con un marcador 6xHis-tag en su extremo C-terminal, por cromatografía de afinidad.

Un segundo componente vital del experimento son las mangas de ADN, las cuales sirven de espaciador y como estándar de fuerza, debido a su deformación característica a 67 pN. Se sintetizaron las mangas por PCR a partir de un plásmido, utilizando un partidor biotinilado y otro tiolado, para obtener un producto final que forme un enlace disulfuro a PpaF y se una a la microesfera recubierta con estreptavidina gracias a la biotina incorporada.

En tercer lugar, se purificó el translocón Sec61 de levadura. Para esto, se separaron fracciones microsomales y se purificó el translocón a partir de ellas utilizando digitonina como detergente. Se preparó al translocón para el experimento incubando con microesferas recubiertas por anticuerpos anti-Sec61.

Se realizó el experimento de espectroscopía de fuerzas para obtener las fuerzas de ruptura de la interacción entre las quimeras de PpaF-DNA y el translocón. Se filtraron los histogramas de fuerza de ruptura a partir del histograma del control negativo sin PpaF, correspondiente a las interacciones inespecíficas que no están en estudio. Se ajustaron los datos al modelo de Dudko-Hummer-Szabo para obtener los parámetros de tiempo de vida ( $\tau_0$ ), distancia al estado de transición ( $\Delta x^\ddagger$ ) y energía libre al estado de transición ( $\Delta G^\ddagger$ ) del proceso de disociación. Los datos ajustaron mejor a un modelo de decaimiento exponencial (ecuación de Bell), que no permite obtener datos de  $\Delta G^\ddagger$ . Los parámetros obtenidos para PpaF silvestre fueron  $\tau_0 = 10 \pm 4$  s y  $\Delta x^\ddagger = 1 \times 10^{-2} \pm 6 \times 10^{-2}$  nm, y para la mutante Ala13Glu se obtuvieron  $\tau_0 = 7 \pm 3$  s y  $\Delta x^\ddagger = 4 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$  nm.  $\Delta x^\ddagger$  tiene una diferencia significativa con  $p < 0,05$ , no así  $\tau_0$ . Las constantes cinéticas de disociación se calcularon como el inverso multiplicativo de  $\tau_0$ :  $k_{off} = 1 \times 10^{-1} \pm 4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  y  $1,4 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  respectivamente, sin diferencias significativas. Por otra parte, a las mismas concentraciones de proteína, las esferas con PpaF Ala13Glu interaccionan un porcentaje significativamente menor (31%) con el translocón que aquellas con PpaF con péptido señal silvestre (49%).

Estos resultados indicarían que el defecto en translocación de la mutación Ala13Glu puede ser multifactorial. Una menor distancia al estado de transición implica una mayor rigidez de la interacción, mientras que una menor adhesividad de las esferas apunta a un efecto negativo sobre la asociación con el translocón, lo que rechaza la hipótesis.

## **ABSTRACT**

Sec61 is a protein transporter channel, known as the translocon, found in the membrane of the endoplasmic reticulum in eukaryotes. Its function is to allow the passage of proteins from the cytosol to the reticular lumen in a process known as translocation, which is the first step in the protein secretory pathway. In humans, about 38% of the proteins synthesized by the cell translocate to the reticular lumen. This is because they possess an amino acid sequence, at its N-terminus, known as a "signal peptide", which plays a role of recruiting the protein to the reticulum membrane and, later, of interaction with the translocon. This last function represents the first step in the translocation process, making it particularly interesting to study.

The signal peptide has a poorly conserved sequence between proteins, however, three common regions are distinguished in all of them: an N-terminal region of positively charged residues (n region), a hydrophobic region in the form of an  $\alpha$  helix (h region) and a C-terminal region of short-chain polar residues (c region). The h region is essential for the translocation process, as mutations in hydrophobic residues in this sequence dramatically decrease translocation and secretion rates. The h region of the signal peptide acts by inserting it into a "lateral gate" of the Sec61 channel, causing a conformational change that opens the pore and leaves the translocon in an active conformation.

To study the translocation process, the *S. cerevisiae* protein Prepro- $\alpha$ -factor (PpaF), which was the first protein described to present a post-translational translocation mechanism in eukaryotes, was used as a model. The Ala13Glu point mutation, in the h region of the PpaF signal peptide, has been shown to decrease the translocation rate by up to 50 times. One hypothesis that would explain this phenomenon is that the Ala13Glu mutation decreases the free energy of the transition state of the dissociation process, while increasing the dissociation kinetic constant, in the interaction between the signal peptide and the Sec61 channel, compared to the protein wild type.

This hypothesis was studied by force spectroscopy using optical tweezers, a tool that allows the interaction between proteins to be measured at the single molecule level (*in singulo*). As a first target, the PpaF protein and its Ala13Glu mutant were prepared for manipulation with optical tweezers. To this end, PCR-directed site mutagenesis was carried out to incorporate a cysteine residue, necessary to covalently bind to proteins, at position 165 (Tyr165Cys mutation). The Tyr165Cys and Ala13Glu/Tyr165Cys mutants were then expressed and purified, both with a 6xHis-tag at their C-terminus, by affinity chromatography.

A second vital component of the experiment are the DNA handles, which serve as a spacer and as a force standard, due to their characteristic deformation at 67 pN. The handles were synthesized by PCR from a plasmid, using a biotinylated and a thiolated primer, to obtain a final product that forms a disulfide bond to PpaF and binds to the microsphere coated with streptavidin thanks to the incorporated biotin.

Third, the yeast Sec61 translocon was purified. For this, microsomal fractions were separated and the translocon was purified from them using digitonin as a detergent. The translocon was prepared for the experiment by incubating with microspheres coated with anti-Sec61 antibodies.

The force spectroscopy experiment was performed to obtain the rupture force of the interaction between the PpaF-DNA chimeras and the translocon. The rupture force histograms were filtered from the histogram of the negative control without PpaF, corresponding to the nonspecific interactions that are not under study. The data were fitted to the Dudko-Hummer-Szabo model to obtain the parameters of lifetime ( $\tau_0$ ), distance to the transition state ( $\Delta x^\ddagger$ ) and free energy to the transition state ( $\Delta G^\ddagger$ ) of the dissociation process. The curve of best fit was to an exponential decay model (Bell equation), which does not allow to obtain data from  $\Delta G^\ddagger$ . The parameters obtained for wild PpaF were  $\tau_0 = 10 \pm 4$  s and  $\Delta x^\ddagger = 1 \times 10^{-2} \pm 6 \times 10^{-2}$  nm, and for the Ala13Glu mutant,  $\tau_0 = 7 \pm 3$  s and  $\Delta x^\ddagger = 4 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$  nm were obtained.  $\Delta x^\ddagger$  has a significant difference with  $p < 0.05$ , but not  $\tau_0$ . The dissociation kinetic constants were calculated as the multiplicative inverse of  $\tau_0$ :  $k_{\text{off}} = 1 \times 10^{-1} \pm 4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  and  $1.4 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  respectively, without significant difference. On the other hand, at the same protein concentrations, spheres with PpaF Ala13Glu interact a significantly lower percentage (31%) with the translocon than those with PpaF with wild-signal peptide (49%).

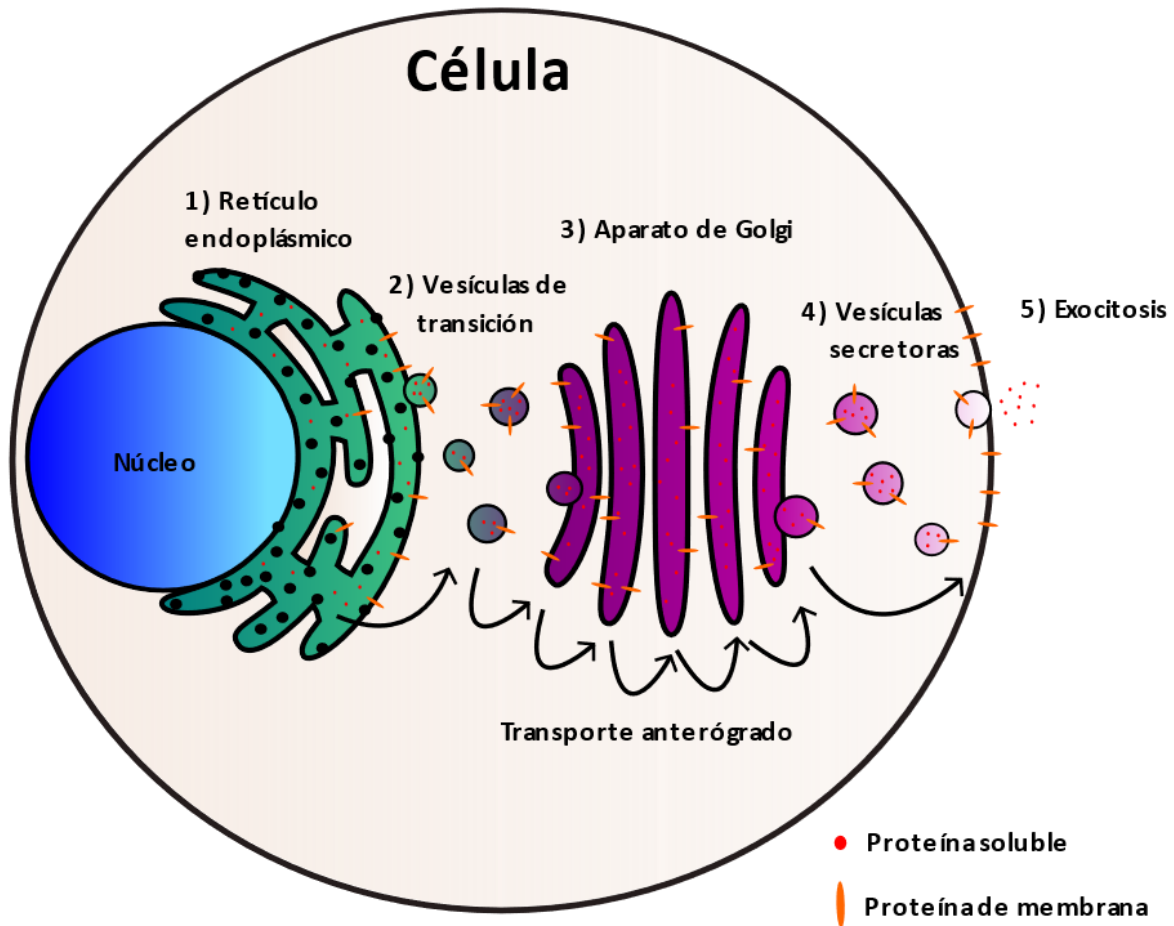
These results would indicate that the translocation defect of the Ala13Glu mutation can be multifactorial. A smaller distance to the transition state implies a greater rigidity of the interaction, while a lower adhesiveness of the spheres points to a negative effect on the association with the translocon. This rejects the original hypothesis.

## **1.-INTRODUCCIÓN**

Al estudiar biología celular de manera tradicional es muy fácil caer en la ilusión de que la célula es una estructura rígida, estática. Cómo no, si para la mayoría de nosotros el estudio básico de las células consiste en fotografías y dibujos, representaciones gráficas sin movimiento. En la realidad, las células son sistemas altamente dinámicos, y deben serlo, puesto que ellas deben alimentarse de nutrientes que provienen del exterior, extraer la energía de estos, comunicarse con otras células, detectar y reaccionar a señales del entorno, etcétera. Las células no se desentienden de su entorno, las membranas que delimitan a las células son altamente maleables y poseen aperturas, con tal de permitir un alto rango de interacciones con el medio externo. Las moléculas de preferencia que utilizan las células para interactuar con su medio y para interpretar señales del exterior son las proteínas, las cuales pueden actuar como señales, receptores de señales o cumplir diversos roles como la captura de nutrientes. Para esto, las células deben ser capaces de transportar las proteínas, que son sintetizadas en el interior, al medio externo donde ejercerán su función. El camino que siguen las proteínas durante este proceso se conoce como vía secretora.

### **1.1.-Vía secretora**

La vía de exportación de proteínas, solubles o de membrana, a través de las diversas estructuras subcelulares, ha sido un intenso objeto de estudio de algunas de las grandes mentes científicas modernas. Su relevancia a nivel celular no puede ser subestimada; se calcula que aproximadamente un 38% del total de las proteínas humanas recorren este trayecto (**Uhlén et al., 2015**). El primero en dilucidar el orden de eventos en la vía secretora fue George Palade, gracias a las técnicas de fraccionamiento subcelular, microscopía electrónica y autorradiografía de pulso y caza (**Caro & Palade, 1964**). En este trabajo, Palade cartografió el camino canónico que siguen las proteínas desde su síntesis hasta su exportación en eucariontes (ver Figura 1). En primer lugar, las proteínas de la vía secretora ingresan al lumen del retículo endoplásmico (RE). Desde el RE, son transportadas mediante vesículas hacia el aparato de Golgi, para luego terminar su recorrido en la membrana externa de la célula gracias a vesículas secretoras.



**Figura 1. Tráfico a través del sistema de endomembranas.** La vía secretora clásica comienza en el retículo endoplásmico rugoso (1) donde existe un procesamiento inicial de las proteínas, como el inicio de la glicosilación. Luego ocurre un transporte vesicular (2) de las proteínas hacia el aparato de Golgi (3). Dentro del Golgi, las proteínas maduran a medida que se transportan de manera anterógrada, vale decir, hacia el exterior. Finalmente, vesículas secretoras (4) transportan a las proteínas solubles al medio externo y a las proteínas de transmembrana a la membrana plasmática, mediante el proceso de exocitosis (5). Los componentes no están a escala.

En las décadas siguientes, Randy Schekman y sus colaboradores ampliaron nuestra visión de la vía secretora, determinando los genes involucrados en cada etapa de este proceso. Aquellas células con mutaciones termosensibles en alguno de estos genes, denominados genes *sec* (del inglés *secretory*), presentan fenotipos, a temperaturas no permisivas, que acumulan proteínas en el interior de un organelo de la vía secretora. El organelo representa el compartimento inmediatamente anterior a la acción del gen mutado, por lo que las proteínas son incapaces de avanzar más allá de ese punto

(**Novick & Schekman, 1979**). Al mutar dos de estos genes, las proteínas se acumulan en el compartimento que se encuentra previo en el orden de eventos de la vía. Gracias a esto se logró determinar el orden de acción de los genes sec en la vía secretora (**Novick et al., 1981**).

Las proteínas de la vía secretora deben atravesar ciertas membranas lipídicas durante su exportación, en un proceso conocido como translocación. La translocación de proteínas a través de la membrana del RE es un paso temprano decisivo de la vía secretora en eucariontes, mientras que en bacterias y arqueas la translocación ocurre a través de la membrana plasmática directamente hacia el medio extracelular (**Park & Rapoport, 2012**). Josefsson y Randall demostraron por primera vez en bacterias que la translocación de proteínas hacia el medio extracelular ocurre tanto de manera cotraduccional como postraduccional (**Josefsson & Randall, 1981a, 1981b**). En la translocación cotraduccional, el ribosoma se acopla a la cara citoplasmática de la membrana y la proteína es sintetizada hacia la cara opuesta; en otras palabras, la síntesis y translocación son procesos concomitantes. En cambio, en la translocación postraduccional, la proteína es sintetizada completamente en el citoplasma y debe atravesar la membrana de manera posterior. Ambos mecanismos serían descritos por separado en la translocación hacia el lumen del RE (**Blobel & Dobberstein, 1975; Rothblatt et al., 1987**). El porcentaje de proteínas que sigue un mecanismo u otro depende en gran medida de la especie. Por ejemplo, se ha estimado que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) transloca aproximadamente un 60% de sus proteínas secretadas y de membrana mediante un mecanismo cotraduccional o mixto, mientras que un 40% lo hace mediante un mecanismo postraduccional (**Ast et al., 2013**). En contraste, se calcula que en humanos solo un 10% de las proteínas de esta vía transloca de manera exclusivamente postraduccional (**Frith et al. 2006; Guo et al. 2018; Lakkaraju et al. 2012**).

La translocación comienza con una fase de orientación, durante la cual los sustratos se dirigen a la membrana gracias a receptores que reconocen señales internas de la proteína o chaperonas unidas a éstas. Posteriormente, las proteínas atraviesan un canal altamente conservado en todos los dominios de la vida: el translocón Sec.

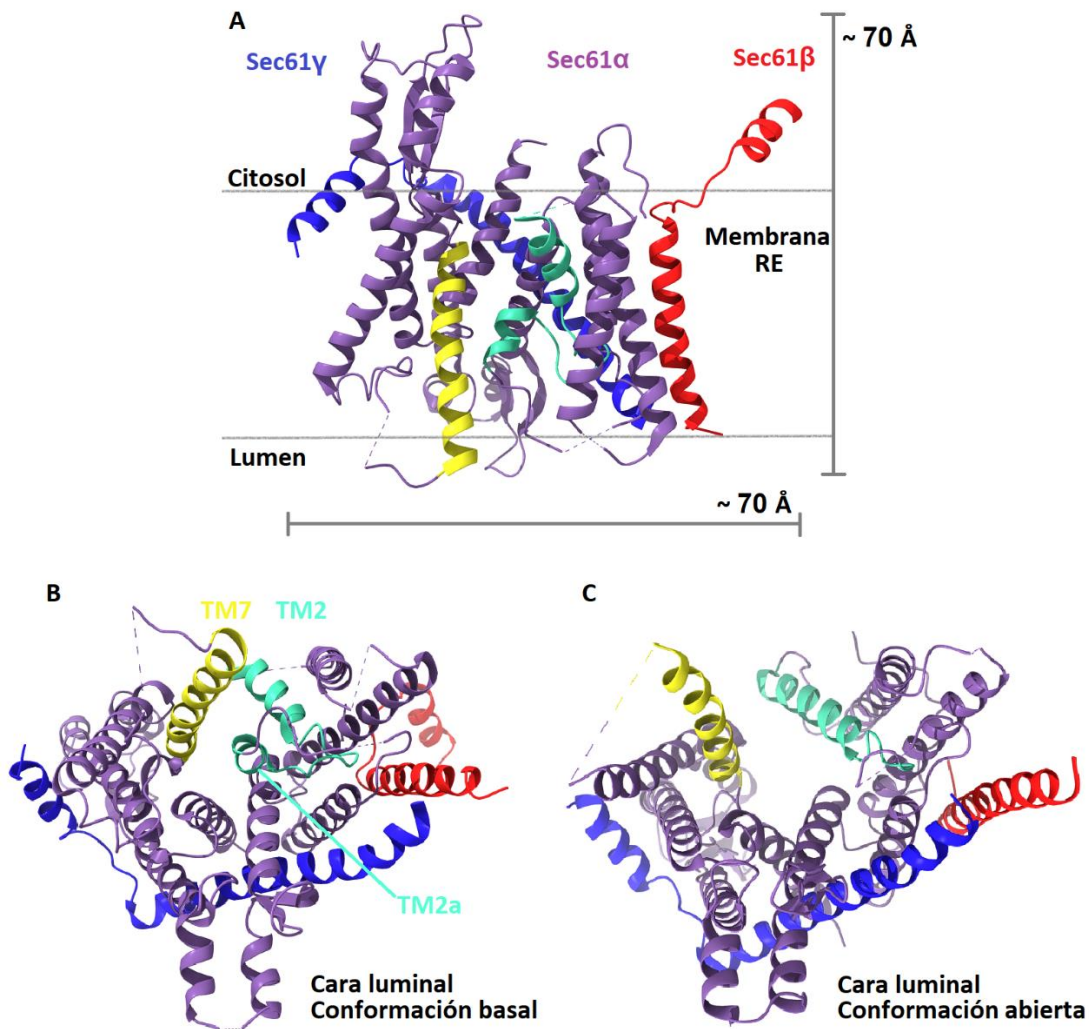


## 1.2.-Estructura y función del translocón Sec

El translocón Sec es un heterotrímero de transmembrana que forma un canal de translocación de proteínas en la membrana del RE en eucariontes y en la membrana plasmática procarionte, llamados Sec61 y SecYEG respectivamente (**Van Den Berg et al., 2004; Voorhees & Hegde, 2016a**). El canal está compuesto por una subunidad central de diez hélices de transmembrana en forma de reloj de arena: SecY en bacterias y arqueas, y Sec61 $\alpha$  en eucariontes. Esta estructura central se encuentra rodeada de dos subunidades pequeñas de una hélice transmembrana, que en eucariontes corresponden a Sec61 $\beta$  y Sec61 $\gamma$ . En procariontes, SecE es homólogo a Sec61 $\gamma$ , mientras que la proteína SecG bacteriana muestra poca identidad de secuencia con Sec61 $\beta$  (**Cao & Saier, 2003; Yuan et al., 2010**). El poro es la parte más estrecha del canal Sec61. Esta estructura presenta cargas positivas en su interior y se encuentra obstruida por una hélice (TM2a), la cual debe desplazarse para permitir la translocación. Ambas características son cruciales, ya que impiden el paso del ión calcio a través del canal y permiten que el RE cumpla una vital función como organelo reservorio de calcio. El canal posee además una compuerta lateral en la interfaz de contacto entre las hélices de transmembrana 2 y 7 (ver Figura 2). Esta compuerta actúa como sitio de reconocimiento de proteínas (**Plath et al., 1998**) y permite la inserción lipídica de los dominios transmembrana de proteínas integrales durante el proceso de translocación (**Gogala et al., 2014; Voorhees & Hegde, 2016b**).

El translocón existe en tres estados: basal, cebado (o preparado, del inglés «primed») y abierto. En el estado basal, las hélices TM2 y 7 permanecen juntas, manteniendo la compuerta lateral cerrada e impidiendo el acceso hacia la membrana lipídica. En esta conformación, la apertura del poro no supera los 2 Å de longitud y la presencia de la hélice TM2a evita el paso de iones y partículas pequeñas a través del canal (**Van Den Berg et al. 2004; Itskanov y Park 2019**; ver figura 2B). Cuando ocurre la interacción del translocón con proteínas accesorias, éste entra en una conformación cebada con una apertura parcial o total de la compuerta lateral y manteniendo al poro obstruido (**Voorhees et al., 2014; Wu et al., 2019**). Para abrir el poro es necesario desplazar la hélice TM2a, esto requiere que ocurra la interacción entre el translocón y una secuencia específica presente en las proteínas de la vía secretora (**Itskanov & Park, 2019**) (ver figura 2C). Para proteínas de membrana, la secuencia que abre el canal es

la primera hélice de transmembrana, mientras que para proteínas solubles se requiere una secuencia conocida como péptido señal (**Haßdenteufel et al., 2019**).



**Figura 2. Estructura del translocón Sec61 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.** En **A)** se aprecia una caricatura de la cadena principal del translocón desde un corte transversal de la membrana del retículo (**PDB ID: 6ND1**). El color morado corresponde a la subunidad mayor, Sec61 $\alpha$ , con 10 hélices de transmembrana. Las hélices TM2 y TM7, resaltadas en color turquesa y amarillo respectivamente, componen la compuerta lateral del translocón, la cual se abre para dar paso a la membrana del RE. Sec61 $\beta$  se muestra en rojo y Sec61 $\gamma$  en azul. En **B)** y **C)** se muestra el translocón desde la cara luminal de la membrana del RE. En **B)** se aprecia la compuerta lateral, formada por las hélices TM2 y TM7, y el poro interno en su conformación cerrada (**PDB ID: 6ND1**). TM2a es una hélice corta que actúa bloqueando el poro en su estado inactivo. En **C)** se

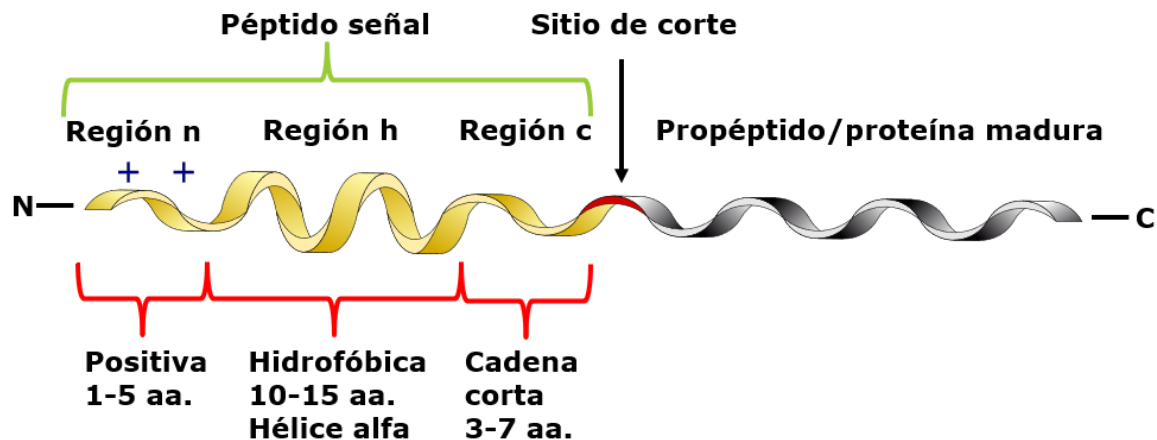
aprecia la compuerta lateral abierta y el poro sin obstrucción, conformación activa que permite la translocación de proteínas. Estructuras resueltas mediante criomicroscopía electrónica (**PDB ID: 6ND1**). **Wu et al. 2019; Itskanov & Park 2019**.

### **1.3.-Péptido señal**

Según el paradigma actual, la mayoría de las proteínas solubles inmaduras de la vía secretora poseen, en su extremo N-terminal, péptidos señal (SP, por sus siglas en inglés *signal peptide*); secuencias de aminoácidos en forma de hélice  $\alpha$  que dirigen la translocación a través de la membrana del RE (**Blobel & Dobberstein, 1975; Walter et al., 1984**). A pesar de que no existe una secuencia de consenso precisa, los SP comparten tres características estructurales clásicas (ver Figura 3):

- 1) Una región cargada positivamente situada en el extremo N-terminal del SP (región n).
- 2) Una región hidrofóbica, en forma de hélice alfa, compuesta de 10 a 15 residuos no polares (región h).
- 3) Residuos con pequeñas cadenas laterales ubicadas cerca del sitio de corte del SP (región c).

El SP es, en la mayoría de los casos, una estructura transitoria en la secuencia de las proteínas, siendo escindida al finalizar la translocación (**von Heijne, 1990**). Su existencia transitoria da un indicio claro de su rol crucial en las primeras etapas de la vía de exportación, que involucra el traslado de la proteína hacia la membrana reticular y la interacción con el translocón Sec61. Las propiedades físicas y químicas del péptido señal son responsables además del mecanismo de translocación utilizado por la célula para cada proteína en particular.



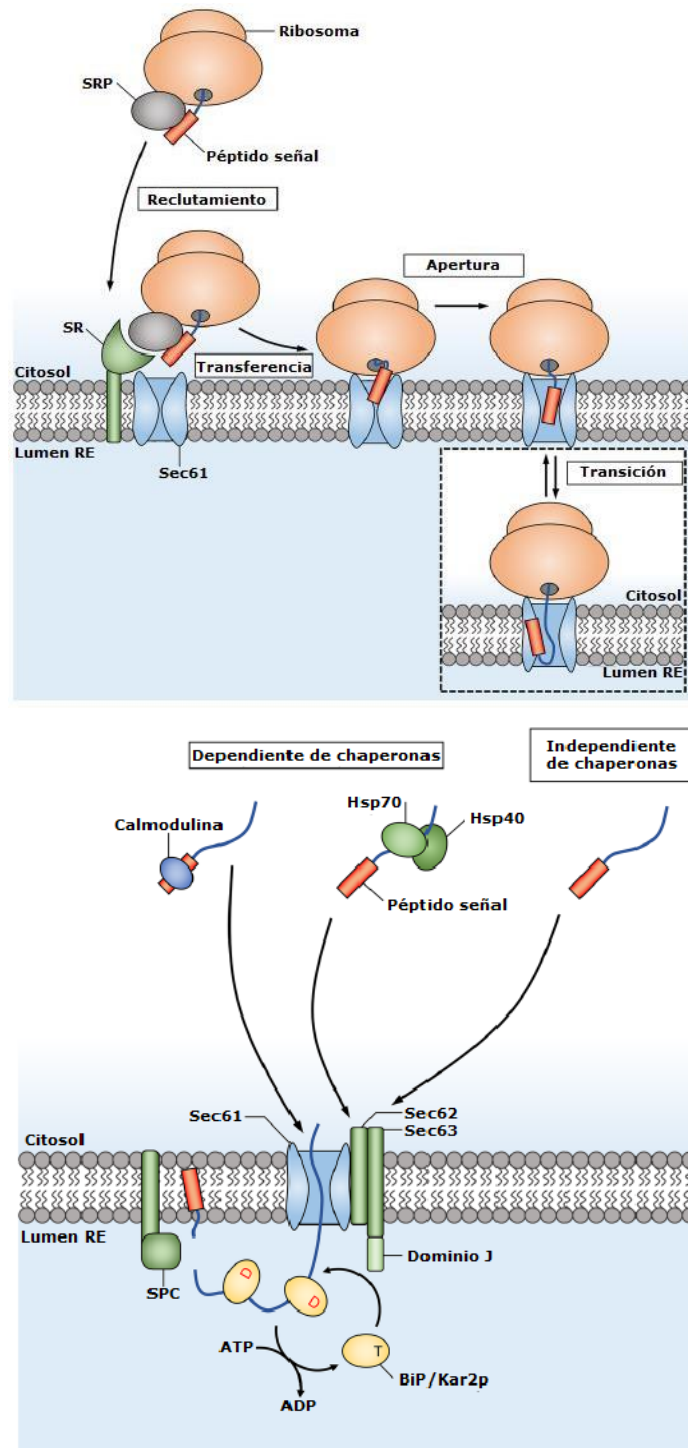
**Figura 3. Representación de la estructura clásica del péptido señal.** La secuencia del péptido señal (amarillo) se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína inmadura. En su extremo N terminal, denominado región n, se encuentran residuos de carga positiva. La región h es la encargada de la interacción con el canal Sec61, está compuesta de residuos apolares y forma una estructura de hélice alfa. La región c es adyacente al sitio de corte (rojo) y se compone principalmente de aminoácidos polares no cargados de cadena corta. Al ser cortado el péptido señal, la secuencia resultante puede corresponder a la proteína madura o un precursor denominado propéptido o propéptido (gris). aa = aminoácidos. Imagen no a escala, no se representa la estructura de la región madura de la proteína.

#### 1.4.-Mecanismos de translocación y rol del péptido señal

Sec61 es un poro pasivo con un interior acuoso, es decir, no ejerce directamente la fuerza necesaria para la translocación. Para lograr un transporte unidireccional desde el citosol al lumen reticular, el canal se asocia con proteínas accesorias que proporcionan la fuerza motriz (**Catipovic et al., 2019; Rapoport et al., 2017**). En la translocación cotraduccional de eucariontes, el canal Sec61 se asocia con el ribosoma (ver Figura 4), el cual empuja a la proteína naciente desde el citosol a medida que ésta se sintetiza. El ribosoma se acopla al translocón Sec interactuando en dos regiones: los segmentos de cadena que unen las hélices 6 y 7, y las hélices 8 y 9 respectivamente (L6/7 y L8/9, del inglés *loop*). Esta interacción abre la compuerta lateral y permite la inserción del SP. (**Becker et al., 2009; Gogala et al., 2014; Görlich & Rapoport, 1993**). En la translocación postraduccional, en cambio, el canal Sec61 se asocia con el complejo

proteico de membrana Sec62/63 (en levaduras se asocian además Sec71 y Sec72, ausentes en mamíferos), abreviado como complejo Sec. El complejo Sec interactúa con el translocón principalmente por la hélice de transmembrana TM3 y además por los mismos segmentos L6/7 y L8/9 al que se asocia el ribosoma (**Itskanov & Park, 2019; Wu et al., 2019**). Por esto último el translocón asociado al complejo Sec es capaz solamente de translocar mediante un mecanismo postraduccional. El dominio J de la proteína Sec63 recluta a la chaperona luminal BiP (Kar2p en levadura); un miembro de la familia de ATPasas Hsp70, que se une a la proteína desde el lumen reticular (ver Figura 4) y actúa como un motor molecular, mediante un mecanismo aún en estudio, desde el interior del RE (**Panzner et al., 1995; Rapoport et al., 2017; Sanders et al., 1992**).

El SP cumple dos funciones principales a lo largo del proceso de translocación. En primera instancia, la secuencia del SP define el mecanismo de translocación que seguirá la proteína. En *S. cerevisiae* se ha descrito que esto ocurre en base al perfil hidrofóbico del SP (**Ast et al., 2013; Ng et al., 1996**). Si el SP es altamente hidrofóbico, éste recluta a la partícula reconocedora de señal (SRP, por sus siglas en inglés *Signal Recognition Particle*); un complejo ribonucleoproteico encargado de orientar al complejo ribosoma-proteína naciente hacia la membrana reticular en la translocación cotraduccional. En la superficie del retículo, SRP es reconocido por una proteína de membrana: el receptor de SRP, o SR (*SRP Receptor*), acoplado a Sec61 (ver Figura 4). Por otra parte, si el SP posee un perfil más hidrofílico, el mecanismo de translocación será preferentemente independiente de SRP y, en consecuencia, postraduccional. En este caso, las proteínas son sintetizadas completamente en el citosol y son recubiertas por chaperonas citosólicas (de las familias Hsp40, Hsp70 y calmodulina) que le permiten mantenerse en un estado desplegado. El receptor de chaperonas en la membrana del RE es el complejo Sec62/63 en sí mismo (**Aviram & Schuldiner, 2017; Zimmermann et al., 2011**).



**Figura 4. Translocación cotraduccional y postraduccional de proteínas a través del canal Sec61. Arriba:** mecanismo cotraduccional. Se representa al complejo ribosoma-péptido naciente siendo reconocido por la partícula reconocedora de señal (SRP). Luego, el complejo es reclutado

a la membrana del RE gracias al receptor de SRP (SR). Finalmente, la translocación ocurre por la fuerza aplicada por el ribosoma, a medida que se sintetiza el péptido hacia el lumen reticular. **Abajo:** mecanismo postraduccional. La proteína se mantiene desplegada gracias a la acción de chaperonas de las familias Hsp70 y Hsp40, y luego estas son reconocidas por el complejo Sec 62/63. El complejo Sec acompaña al translocón y lo mantiene en un estado permisivo para la translocación. En el lumen reticular, la chaperona BiP (Kar2p en levadura) unida a ATP (T) es reclutada por el dominio J de Sec63, el cual estimula la actividad ATPasa de la chaperona. En su estado unido a ADP (D), BiP se une a su sustrato peptídico y permite el movimiento unidireccional, mediante un mecanismo que sigue en estudio. Imagen adaptada de **Van Puyenbroeck & Vermeire, 2018**.

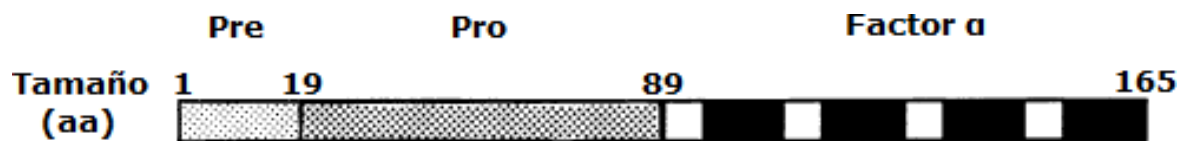
En mamíferos, la selección del mecanismo de translocación parece estar determinada por otros factores, tales como el tamaño de la proteína y las cargas positivas del SP. Actualmente el consenso es que las proteínas con una longitud mayor a 160 residuos dependen fuertemente de un mecanismo cotraduccional, mientras que aquellos péptidos de longitud menor translocan, al menos en parte, por mecanismo postraduccional (**Guo et al., 2018; Lakkaraju et al., 2012**). El rol de cargas positivas en la región n de péptidos pequeños (menores a 140 aminoácidos), es controversial. Mientras un estudio (**Guo et al., 2018**) observa que perder la carga positiva reduce la capacidad de estos péptidos de seguir una ruta postraduccional, otro (**Ziska et al., 2019**) observa, al contrario, que perder la carga positiva aumenta la dependencia a un mecanismo postraduccional. Se está comenzando a dilucidar que secuencias en la región madura de las proteínas, vale decir después del sitio de corte del SP, también podrían jugar un rol en la determinación del mecanismo (**Ziska et al., 2019**).

La otra función relevante del SP en ambos mecanismos de translocación es la apertura del poro, mediante el desplazamiento de la hélice TM2a. Esto ocurre gracias a la inserción del SP en el bolsillo hidrofóbico formado por la apertura de la compuerta lateral del translocón (**Itskanov & Park, 2019; Voorhees & Hegde, 2016b; Wu et al., 2019**). A pesar de que se tiene información estructural detallada de esta interacción, aún se desconocen puntos cruciales de la misma. Hasta la fecha no se ha dilucidado cuál es el tiempo fisiológico de interacción entre el SP y el translocón, el cual debe ser suficiente, por ejemplo, para permitir la unión de la chaperona BiP a la proteína en translocación postraduccional (constante cinética de asociación de BiP a su proteína sustrato,  $k_{on}$ , entre 0,01 y 0,001  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ; **Marcinowski et al., 2011; Ramírez et al., 2017**). Tampoco se conoce con certeza qué aminoácidos del SP son cruciales para la estabilidad de esta

interacción, si es que los hay. Se ha visto que mutaciones en residuos puntuales del SP (y no sus vecinos) son suficientes para reducir la translocación de una proteína hasta niveles patológicos (**Godi et al., 2009; Guo et al., 2014**).

### 1.5.-*Prepro-alpha-factor* como modelo de estudio de translocación

La primera proteína descubierta en presentar un modo de translocación postraduccional en eucariontes fue *Prepro-alpha-factor* (PpaF, también llamada *Mating factor alpha-1 precursor*) de *S. cerevisiae* (**Hansen et al., 1986; Matlack et al., 1999**). PpaF es el precursor de la feromona de apareamiento *alpha-factor* ( $\alpha$ F), la cual es secretada en su forma madura al medio externo para gatillar la reproducción sexual entre parejas celulares compatibles en levadura (**Rothblatt et al., 1987**). PpaF posee 165 aminoácidos: los 19 residuos del extremo N terminal corresponden al SP, seguidos por una secuencia de 70 aminoácidos que forman el propéptido (ver Figura 5), el cual no se encuentra en la forma madura de la feromona (**Waters et al., 1988**). Finalmente, en el extremo C-terminal, se encuentran cuatro repeticiones de  $\alpha$ F, intercaladas por secuencias que son escindidas durante la maduración (**Rothblatt et al., 1987**).



**Figura 5. Representación gráfica de la secuencia de *Prepro-alpha-factor*.** Los primeros 19 residuos desde el extremo N terminal corresponden al SP («Pre», puntos claros), luego se encuentra el propéptido, una secuencia transitoria que se extiende hasta el residuo 89 («Pro», puntos oscuros). El factor de apareamiento alfa se encuentra repetido cuatro veces en la secuencia, en el extremo C terminal («Factor  $\alpha$ », en negro), intercalado por secuencias que son escindidas durante la maduración (en blanco). aa = aminoácidos. Imagen adaptada de **Rothblatt et al., 1987**.

Se ha descrito anteriormente que una mutación puntual de alanina por glutamato en un residuo del SP de PpaF (Ala13Glu) es suficiente para disminuir drásticamente, al



menos 25 veces, la tasa de translocación hacia el lumen reticular *in vivo*, y hasta 50 veces la tasa de translocación *in vitro* (**Allison & Young, 1988, 1989**). La mutación de la alanina vecina (Ala14Glu) solamente redujo la tasa de translocación 6 veces *in vivo* y 8 veces *in vitro*, apuntando a la importancia en particular del residuo Ala13 en la translocación de esta proteína. Una posible explicación para este fenómeno es que el residuo mutado es especialmente relevante en la interacción entre el péptido señal y el translocón Sec61. El residuo Ala13 es de carácter hidrofóbico, y se encuentra en la región h de interacción con la compuerta lateral del translocón. La mutación por glutamato, un aminoácido con carga negativa a pH fisiológico ( $pK_a = 4,25$ ) podría desestabilizar la interacción con el bolsillo hidrofóbico de la compuerta, lo que disminuiría el tiempo de interacción entre ambas especies ( $\tau$ , tiempo de vida). La disociación prematura del SP impediría la activación efectiva del poro e inhibiría el inicio de la translocación. El efecto de esta mutación en la cinética de interacción continúa siendo un problema abierto y resulta una oportunidad interesante para estudiar el primer paso de la translocación. A pesar de que la translocación ha sido estudiada en detalle a lo largo de las décadas, no existen a mi conocimiento trabajos publicados que abarquen el aspecto cinético o termodinámico de la interacción entre el SP y el translocón Sec; resolver este problema resulta un primer paso crucial para comprender la translocación desde un punto de vista fisicoquímico.

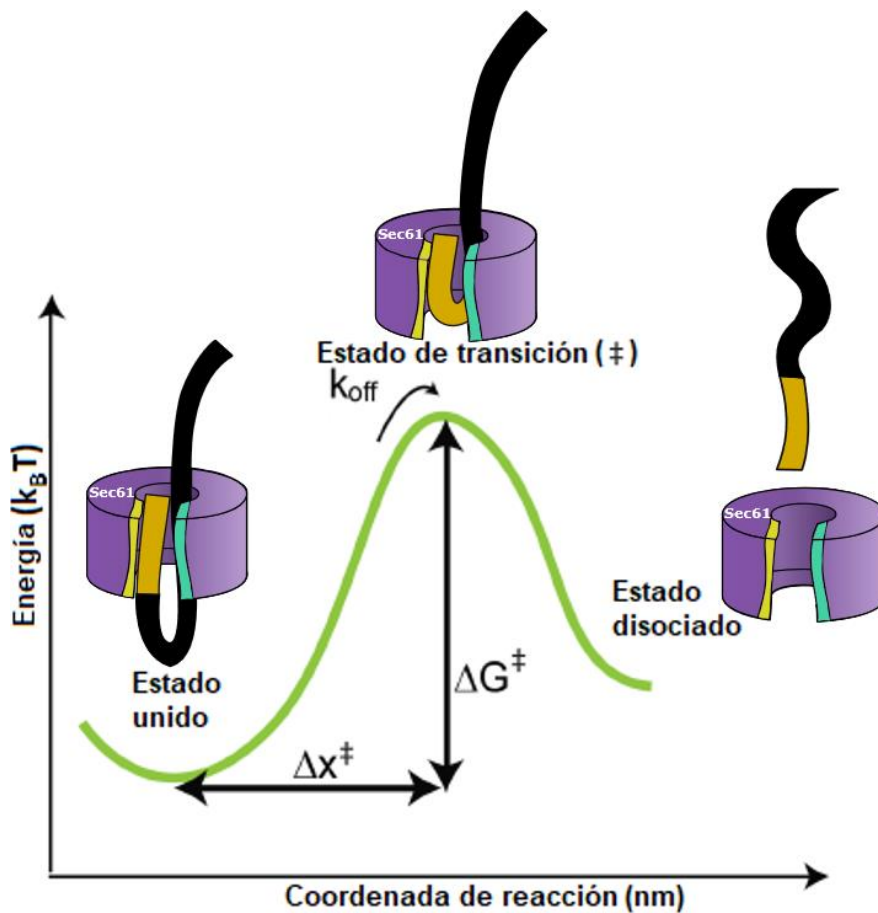
## **1.6.-Estudio de la cinética de interacción a nivel de molécula individual mediante pinzas ópticas**

La interacción entre el SP y Sec61 es del orden molecular, vale decir, hablamos de distancias de nanómetros ( $10^{-9}$  m). La forma histórica de estudiar procesos a esta escala, ya que son demasiado pequeños incluso para el más poderoso de los microscopios ópticos, ha sido observar el comportamiento de grandes grupos de moléculas, y medir aquellas propiedades que sí se manifiestan a escalas detectables. Sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado métodos lo suficientemente sensibles para medir las propiedades de una, o unas pocas, moléculas (**Quiroga-Roger et al., 2020**). Estos avances nos han permitido tener una imagen más clara y completa del funcionamiento de la célula, a su nivel más fundamental.

Uno de los métodos para el estudio de moléculas individuales (estudios *in singulo*) es la espectroscopía de fuerzas. La espectroscopía de fuerzas es la medición de fuerzas ejercidas por, o sobre, las moléculas para obtener datos acerca de su comportamiento, como la estabilidad de su estructura o su tiempo de interacción con otras moléculas. Ahora, recordemos que las moléculas son inimaginablemente pequeñas (hasta 10.000 veces más pequeñas que el grosor de un cabello), por lo que las fuerzas que ejercen o que son capaces de soportar son, a su vez, increíblemente más tenues que aquellas que sentimos en nuestro día a día. Es por esto que se requieren equipos de alta sensibilidad, siendo uno de los más prominentes el atrapamiento óptico mediante láser, también conocido como pinzas ópticas.

El atrapamiento óptico es un fenómeno en el cual partículas pueden ser fijadas, e incluso manipuladas, mediante haces de luz (**Ashkin et al., 1986; Bustamante & Smith, 2006, 2007**). Esto se debe a que los fotones (partículas de luz) poseen un momento lineal, que es luego transferido a cualquier objeto que desvíe los rayos de luz; en pocas palabras, la luz ejerce fuerzas sobre las partículas. Las pinzas ópticas utilizan este fenómeno enfocando láseres en un volumen muy pequeño (de diámetro del orden micrométrico [ $10^{-6}$  m]) para mantener partículas de esta misma escala o menores atrapadas en un punto. Para manipular moléculas, éstas pueden adherirse directamente a la superficie de partículas micrométricas, o a través de extensores como las mangas de ADN, para luego ser atrapadas por láser.

Recientemente, se ha descrito un método por pinzas ópticas para medir las fuerzas de ruptura de la interacción entre una proteína ligando y su receptor (**Burgos-Bravo et al., 2018**). Los datos de fuerza de ruptura de la interacción permiten obtener parámetros cinéticos gracias al ajuste a modelos matemáticos, tales como el modelo fenomenológico de Bell (**Bell, 1978**) y los modelos de Dudko-Hummer-Szabo (**Dudko et al., 2006, 2008**; descritos en detalle en la sección de metodología 4.2.12). En nuestro caso, si la mutación Ala13Glu de PpaF en efecto desestabiliza la interacción con el translocón, se verán afectados los parámetros cinéticos de disociación (ver figura 6) que se obtienen a partir de los modelos mencionados. Con esta metodología se podrá explorar directamente la interacción proteína-proteína, entre el péptido señal de PpaF y el translocón Sec61, asegurando que los encuentros ocurran solamente entre dos moléculas.



**Figura 6. Perfil energético de la interacción entre el SP y el translocón Sec61.** El modelo más simple de interacción incluye un estado unido (izquierda) y un estado disociado (derecha) entre el translocón (en morado, hélices que componen la compuerta se ven representadas en turquesa y amarillo) y el SP de *Prepro-alpha-factor* (en color dorado). Para que ocurra la disociación de las especies, ambas proteínas deben separarse una distancia suficiente ( $\Delta x^\ddagger$ ) para cruzar la barrera de energía al estado de transición ( $\Delta G^\ddagger$ ). La constante de disociación,  $k_{off}$ , es independiente de la concentración de ambas especies, y corresponde al inverso multiplicativo del tiempo de vida  $\tau$  de la interacción. Imagen adaptada de **Burgos-Bravo et al., 2018**.

## **2.-HIPOTESIS**

**«Una mutación puntual de un aminoácido hidrofóbico por uno ácido en la región h del péptido señal de translocación reticular disminuye la diferencia de energía libre del estado de transición y aumenta la constante cinética de disociación, en la interacción con el translocón Sec61»**

## **3.-OBJETIVOS**

### **3.1.-Objetivo general**

Determinar los parámetros cinéticos y termodinámicos de la interacción entre el péptido señal silvestre de *prepro-alpha-factor*, y con la mutación Ala13Glu, con el translocón Sec61 de levadura, mediante espectroscopía de fuerzas por pinzas ópticas.

### **3.2.-Objetivos específicos**

**3.2.1.-** Diseñar, sintetizar el plásmido y purificar las mutantes de prepro-alpha-factor Tyr165Cys y Ala13Glu/Tyr165Cys funcionalizadas con cisteína para su uso en pinzas ópticas.

**3.2.2.-** A partir de las mutantes purificadas, sintetizar quimeras de proteína-ADN mediante ligación covalente a mangas de ADN biotiniladas y tioladas, para permitir la unión a las microesferas de poliestireno del sistema de pinzas ópticas.

**3.2.3.-** Obtener el translocón Sec61 purificado y funcional en detergente, para su estudio a nivel de molécula individual mediante pinzas ópticas.

**3.2.4.-** Determinar la constante cinética de disociación, la energía libre del estado de transición y la distancia del estado de transición, en la interacción entre el péptido señal de las mutantes de prepro-alpha-factor Tyr165Cys y Ala13Glu/Tyr165Cys, con el translocón Sec61, mediante espectroscopía de fuerzas por pinzas ópticas.

## **4.-MATERIALES Y METODOLOGIA**

### **4.1.-REACTIVOS E INSUMOS**

Nuestra experiencia como laboratorio nos ha enseñado que existen diversos factores que afectan la reproducibilidad de un experimento. Uno de ellos es la contaminación o mal manejo de ciertos lotes de reactivos, ya sea de parte de la empresa o de los usuarios. Como parte de nuestras prácticas, mantenemos registro y reportamos no solo los productos utilizados, sino también su número de lote. Esta acción permite identificar problemas con mayor rapidez, aclarar resultados paradójicos (**Wilson, 2011**) y avisar a la empresa responsable e incluso a otros laboratorios que hayan comprado el mismo lote del producto.

**Tabla 1. Reactivos utilizados.**

<b>Reactivo o insumo</b>	<b>Marca/número de catálogo</b>	<b>Número de lote</b>
2,2-dipiridil disulfuro	Sigma-Aldrich/D5767-1G	BCBM0814V
2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich/M6250	SHBD8455V
Acrilamida	Invitrogen/15512023	0525C506
Agarosa	Lonza/50002	0000665589
Ampicilina sal de sodio	Sigma-Aldrich/A0166	045M4844V
Anticuerpo Anti-6X His tag®	Abcam/AB9108	GR3247563-4
Anticuerpo secundario Anti-IgG de conejo	Invitrogen/G-21234	1946344
Coomassie® Brilliant Blue R250	Merck/42660	K44661253 342
Columna His-Trap™ High Performance, 1 mL	GE Healthcare/17-5247-01	-
Columnas Micro Bio-Spin® 6	Bio-Rad/7326221	130051813
DTT	Gold Bio/DTT25	1473.060313A

HiSpeed® Plasmid Midi Kit	QIAGEN/12643	133230076
Imidazol	US Biological/I7000	L7030931
Leupeptina	Sigma-Aldrich/L0649	126K8601V
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN/27104	154039727
QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent/200521	3612392
Oligómeros de ADN químicamente modificados -bio y -SH	IDT/143384256	199985438
Pepstatina	Sigma-Aldrich/P5318	048M4002V
Pimelimidato de dimetilo	Thermo-Fisher/21666	TI266036
PMSF	Sigma-Aldrich/78830-1G	BCBM8647V
Proteínasa K	Promega/V3021	49947
Reactivo de Bradford	Bio-Rad/5000006	64183744
SBTI	Sigma-Aldrich/ T9003-100MG	SLBG4123V
<i>SYBR</i> <sup>™</sup> green I	Invitrogen/S7563	1825741
Tubos de centrífuga de 15 y 50 mL	ISOLAB/ 078.02.007 078.02.008	CTPPA5015001 CTPPS6050003
TURBO <sup>™</sup> DNase	Invitrogen/AM2238	016R061441A
Tripsina	Santa Cruz/sc-391055	L1713
Tritón X-100	Merck/9410-OP	15J280008

**Tabla 2. Listado de anticuerpos y antígenos utilizados para su síntesis.**

<b>Anticuerpo (tipo)</b>	<b>Antígeno</b>
Anti-BiP (policlonal de conejo)	Péptido sin determinar proveniente de BiP (Kar2) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Secundario Anti-conejo (policlonal de cabra, Abcam, Reino Unido)	IgG de conejo
Anti-His (policlonal de conejo, Abcam, Reino Unido)	6xHis-KLH (HHHHHH-KLH)
Anti-PpaF (policlonal de conejo)	Proteína de fusión LacZ-PpaF
Anti-Sec61 (policlonal de conejo)	Péptido C-terminal del translocón Sec61, residuos 472-480 (porción citoplasmática) fusionado a BSA Secuencia: CLVPGFSDLM
Anti-Sec63 (policlonal de conejo)	Dominio J de Sec63 (luminal) fusionado a proteína A
Anti-Sec72 (policlonal de conejo)	Sec72-6xHis

Los anticuerpos que no son de origen comercial (BiP, PpaF, Sec61, Sec63 y Sec72) fueron donados amablemente por el laboratorio del Dr. Randy Schekman (UC Berkeley MCB). KLH: hemocianina de lapa californiana (*keyhole limpet hemocyanin*); BSA: albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*).

## **4.2.-METODOLOGIA**

### **4.2.1.- Modelamiento de mutantes de PpaF**

Con el fin de observar el efecto de las diversas mutaciones en la estructura de PpaF, se modeló la estructura tridimensional de tres secuencias (secuencia silvestre, con mutación Tyr165Cys y etiqueta 6xHis-tag C-terminal, y con mutaciones Ala13Glu/Tyr165Cys y etiqueta 6xHis-tag C-terminal) utilizando los servidores C-QUARK e I-TASSER (Roy et al., 2010; Yang et al., 2015; Zhang, 2008; Zheng et al., 2019). Como complemento, se utilizó el servidor de predicción de estructura secundaria JPred4 (Drozdetskiy et al., 2015).

#### 4.2.2.- Construcción de plásmidos de mutantes de Ppaf

El plásmido pMAH1, con una copia del gen MF(ALPHA)1 (codificante para *Prepro-alpha-factor*) con etiqueta 6xHis-tag C-terminal (**Bush et al., 1991**), fue facilitado gentilmente por el Dr. Gregory S. Payne (UCLA David Geffen School of Medicine). Previamente, en el laboratorio, se realizó mutagénesis de sitio dirigido por PCR del residuo Tyr165 por Cys para la ligación covalente de mangas de ADN. A partir de esta construcción, se diseñaron partidores para la mutación Ala13Glu, reemplazando el codón para alanina del gen (GCA) por un gen que codifica para ácido glutámico (GAA). Esta mutación cambia una sola base del codón y se encuentra en concordancia con la preferencia codogénica de *E. coli*. Se llevó a cabo la mutación Ala13Glu en la región h del péptido señal de PpaF, utilizando el kit *QuikChange® site-directed mutagenesis* (Invitrogen, EE. UU.). Por último, se secuenciaron los plásmidos mediante el servicio *Sequetech DNA Sequencing Service* (Sequetech, EE. UU.) para corroborar las mutaciones.

#### 4.2.3.- Expresión y purificación de la proteína Ppaf

Los plásmidos con las mutaciones Tyr165Cys y Ala13Glu/Tyr165Cys en el gen MF(ALPHA)1 fueron transformados según el método descrito por Inoue y cols. (**Inoue et al., 1990**) en una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) secY<sup>ts</sup> (**Bush et al., 1991**), facilitada gentilmente por el Dr. Gregory S. Payne (UCLA David Geffen School of Medicine), y depuradas para su competencia por Hilda Alfaro Valdés, MSc (FaCiQyF, Universidad de Chile). La sobreexpresión de PpaF se indujo a 42 °C por 4 h partiendo de una densidad óptica a 600 nm entre 0,4 y 0,8. Se concentraron las células por centrifugación, descartando el sobrenadante. Para la purificación de PpaF, las células fueron resuspendidas en tampón de lisis (3 mM DTT, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0). Luego, se adicionó PMSF 1 mM, pepstatina 1,5 μM y leupeptina 1 μM. Las bacterias fueron lisadas por sonicación y los residuos celulares fueron separados mediante una segunda centrifugación. Se descartó el sobrenadante y adicionó tampón de lisis con 8 M de urea para la resuspensión, centrifugando nuevamente. El sobrenadante se cargó en una columna *His-Trap HP* pre-ensavada de 1 ml (GE Healthcare Life Science, EE. UU.), previamente equilibrada con tampón de lisis. La columna cargada se lavará para eliminar impurezas con 10 ml de tres soluciones de lavado (8 M Urea, 3 mM DTT, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris, a pH 8,0, pH 6,3 y pH 5,9 respectivamente). Finalmente, la



proteína deseada fue eluida en un gradiente de imidazol (US Biological, EE. UU.) de 10 a 250 mM. Se cuantificaron las proteínas por método de Bradford en lector de placas Tecan. La identidad de las proteínas fue corroborada por espectrometría de masas (Taplin Mass Spectrometry Facility, Harvard University, EE. UU.) y mediante electroforesis en gel de acrilamida con SDS (SDS-PAGE) con posterior análisis utilizando el software ImageJ (NIH, EE. UU.). Se corroboró además la proteína silvestre por medio de electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado (técnica *Western blot*) utilizando anticuerpo primario Anti-PpaF policlonal.

#### **4.2.4.- Síntesis de mangas de ADN biotiniladas y tioladas**

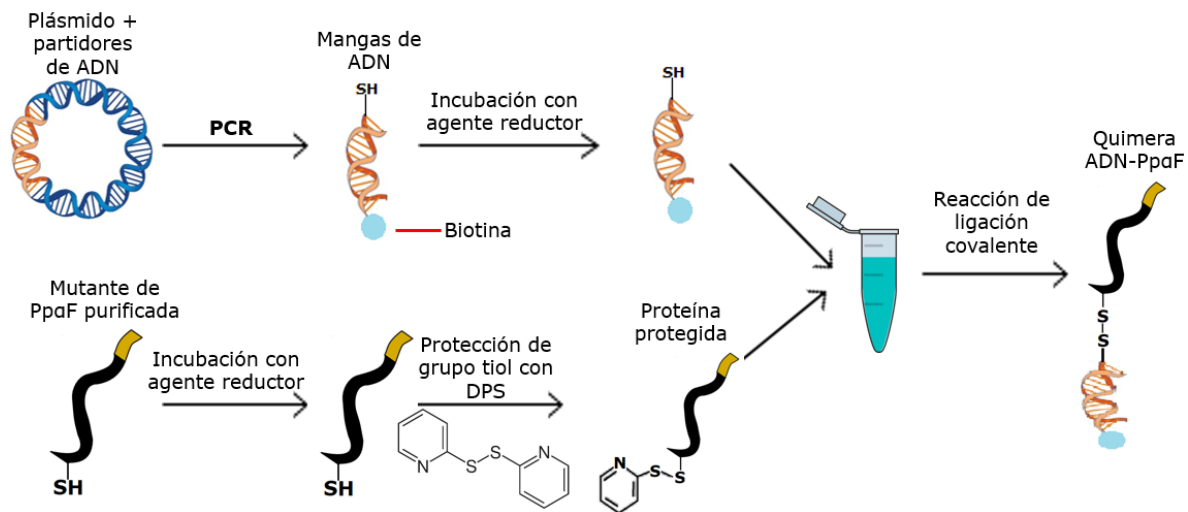
Cada manga de ADN de 558 pb de longitud se sintetizó mediante PCR a partir del plásmido pGEMEX-1 (Promega, EE. UU.; donado amablemente por el laboratorio del Dr. Carlos Bustamante, UC Berkeley), según el protocolo descrito por Cecconi y cols. (**Cecconi et al., 2008**). Para la producción de mangas de ADN, el volumen de reacción fue de 9,6 ml y se utilizaron como partidores oligómeros de ADN modificados con biotina y trietilenglicol (TEG) como espaciador, y SH en el extremo 5' (IDT, EE. UU.). La secuencia de los partidores es: 5'-tiol-GCT-ACC-GTA-ATT-GAG-ACC-AC-3' y 5'-biotina-TEG-CAA-AAA-ACC-CCT-CAA-GAC-CC-3'. Las mangas de ADN se purificaron con el kit *HiSpeed® Plasmid Midi* (Qiagen, Alemania) usando 3 mM DTT en cada paso. Se corroboró mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) al 6% y tinción con SYBR™ green I (Invitrogen, EE. UU.), con análisis mediante software ImageJ (NIH, EE. UU.).

#### **4.2.5.- Ligación de las mutantes de Ppaf con mangas de ADN para su uso en pinzas ópticas**

Se activaron las proteínas purificadas según el método descrito por Wilson (**Wilson, 2011**). Brevemente, la proteína se incubó con DTT 10 mM por 4 h a temperatura ambiente. La proteína se pasó a través de una columna *Micro Bio-Spin® 6* (Bio-Rad, EE. UU.) equilibrada con 2,2'-dipiridil disulfuro (DPS; Sigma-Aldrich, EE. UU.) 100 µM. El producto de reacción de cisteína con DPS se detecta como un aumento de la absorbancia a 343 nm (**Shank, 2004**). Se añadió DPS a la solución de muestra y se incubó por dos horas en oscuridad a temperatura ambiente. Al completarse la reacción, se eliminó el exceso de DPS utilizando dos columnas *Micro Bio-Spin® 6* y se inició la reacción con el ADN. Las mangas de ADN se incubaron previamente con DTT, el cual fue removido

utilizando las mismas columnas del procedimiento de eliminación de DPS. La solución de ADN reducida reaccionó con las proteínas activadas con DPS durante la noche en oscuridad. La concentración final de ADN se mide mediante la razón de absorbancia a 260 y 280 nm ( $A_{260/280}$ ; lector de placas Tecan). Se asumió una eficacia del 20% de ligación para estimar la concentración real de las quimeras.

Para corroborar la ligación, se incubaron 200 ng de mangas de ADN con PpaF en DTT (1 mM por 5 min a 37 °C), proteinasa K (50 µg/ml por 10 min a 37 °C) o DNasa I (2 U/µL por 10 min a 37 °C). Los productos de hibridación y de digestión se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y tinción con SYBR™ green I (Invitrogen, EE. UU.) mediante software ImageJ (NIH, EE. UU.).



**Figura 7. Método de ligación de proteínas a mangas de ADN.** Arriba: El plásmido pGEMEX-1 es incubado junto con los partidores con modificación de biotina y grupo tiol (SH) para la reacción de PCR. Las mangas de ADN obtenidas en la reacción son tratadas con agente reductor DTT para impedir su dimerización. Abajo: Las mutantes de PpaF con cisteína C-terminal (con grupo tiol, SH), o la proteína silvestre (sin SH) como control, son incubadas con agente reductor y luego, mediante cambio de solvente, con DPS para protección del grupo tiol. La proteína protegida es incubada con las mangas de ADN en ausencia de reductor mediante cambio de solvente, lo que permite la reacción de ligación. Como producto final se obtiene un porcentaje de moléculas de fusión (quimera) de proteína-ADN-biotina (no a escala) y un porcentaje de dímeros de ADN (no presentes en la imagen).

#### 4.2.6.- Purificación de liticasa recombinante

Se cultivó la cepa de *E. coli* RSB 805 productora de liticasa (donada gentilmente por el laboratorio del Dr. Randy Schekman, UC Berkeley MCB) en placas de agar LB + Antibiótico ampicilina (Amp) 200 µg/mL, y fue incubada a 37 °C durante la noche en estufa. A partir de una colonia aislada se inoculó un tubo de 2 mL de medio LB + Amp 200 µg/mL, el cual se incubó a 37 °C por 5 h a 220 rpm en incubadora con agitación orbital. Al alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) cercano a 1 (espectrofotómetro Jenway), se utilizó esta muestra para inocular un matraz con 300 mL de medio LB + Amp 200 µg/mL a un  $OD_{600}$  inicial de 0,001. El matraz fue incubado a 37 °C y 220 rpm durante la noche.

Para escalar la producción de liticasa, se repartieron 9,8 L de medio LB en siete matraces con 1,4 L cada uno, autoclavados a 121 °C por 45 min. Los matraces con medio fueron precalentados a 37 °C durante toda la noche, luego fue añadida Amp hasta una concentración de 200 µg/mL e IPTG hasta 0,4 mM, y fueron inoculados con el matraz de 300 mL hasta un  $OD_{600}$  inicial de 0,07. Los matraces fueron incubados a 37 °C y 220 rpm durante 4 h y 30 min, alcanzando un  $OD_{600}$  promedio de 1,5. Se precipitaron las bacterias por centrifugación (centrífuga Sorvall, rotor GSA) a una fuerza centrífuga relativa (RCF) de 4.080 por 30 min. Por limitación de la capacidad de volumen de las botellas, se centrifugaron 1,2 L a la vez, mientras el resto se mantuvo en las condiciones de incubación. Se descartó el sobrenadante y el precipitado celular fue resuspendido en 200 mL de tampón 25 mM Tris a pH 7,5, a temperatura ambiente. Se precipitó nuevamente por centrifugación a 4.080 RCF por 30 min. Se resuspendió el precipitado en 100 mL de tampón 25 mM Tris pH 7,5 y 400 µL de EDTA 500 mM a temperatura ambiente. Una vez resuspendido, se añadieron 100 mL de sacarosa 40% disuelta en tampón Tris y se mezcló con agitador magnético durante 20 min a baja velocidad. Se precipitaron las bacterias nuevamente a 4.080 RCF por 30 min, se descartó el sobrenadante y se añadieron 150 mL de  $MgSO_4$  previamente enfriado en hielo para inducir la lisis osmótica. En hielo, se resuspendió cuidadosamente el precipitado con espátula y luego se agitó suavemente por 20 min con agitador magnético. Se precipitaron los residuos celulares a 6.000 RCF, 4 °C por 40 min (centrífuga Hettich, rotor 1620A) en tubos de centrífuga de 50 mL (ISOLAB, Alemania). Se recuperó el sobrenadante, en donde se encuentra la liticasa soluble, y se desechó el precipitado. Se

congeló rápidamente con nitrógeno líquido y fue almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en tubos de centrífuga de 15 mL (ISOLAB, Alemania).

#### **4.2.7.- Ensayo de actividad de liticasa recombinante**

La enzima liticasa cataliza la degradación de la pared celular de las levaduras. Para medir su actividad, se sigue la disminución del  $\text{OD}_{600}$  de una muestra de levadura en presencia de distintas concentraciones de la enzima.

Se inocularon dos matraces con 25 mL de medio YPD autoclavado con la cepa de levadura *S. cerevisiae* RSY 1255, donada amablemente por el laboratorio del Dr. Randy Schekman (UC Berkeley MCB), a un  $\text{OD}_{600}$  inicial de 0,004 y 0,008 respectivamente (espectrofotómetro Jenway) a partir de un inóculo previamente saturado ( $\text{OD}_{600} = 4,32$  almacenado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Se incubó por 17 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm en incubadora con agitación orbital hasta un  $\text{OD}_{600}$  final de 0,600 y 1,110 respectivamente. La medición de  $\text{OD}_{600}$  se realiza en cubetas de 1 mL, y es común tratarla como una unidad arbitraria de cantidad de células, vale decir, si tenemos un  $\text{OD}_{600} = 0,6$  en 1 mL, en los 25 mL de cultivo decimos tener una cantidad equivalente a 15  $\text{OD}_{\text{eq}}$  de células (de esta manera podemos hablar de una cantidad de células desconocida sin la necesidad de definir su concentración real). Utilizo el cambio de nomenclatura para distinguir la medición real en espectrofotómetro ( $\text{OD}_{600}$ ) de la unidad arbitraria de cantidad ( $\text{OD}_{\text{eq}}$ ). Se centrifugó una cantidad de células equivalente a 15  $\text{OD}_{\text{eq}}$ , a partir de 23 mL del matraz a  $\text{OD}_{600} = 0,600$  y 1 mL del matraz a  $\text{OD}_{600} = 1,110$ , a 1.600 RCF por 5 min (centrífuga Hettich, rotor 1620A). Se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 25 mL de  $\text{dH}_2\text{O}$  para su lavado y se centrifugaron nuevamente a 1.600 RCF por 5 min. Se resuspendieron las células a 7,5  $\text{OD}_{\text{eq}}/\text{mL}$  en tampón 50 mM Tris pH 7,5 enfriado en hielo. Los pasos siguientes fueron realizados en hielo.

Se ensayó la actividad de liticasa en dos condiciones reductoras:

- 1.-** 50 mM Tris pH 7,5, 40 mM 2-mercaptoetanol (BME).
- 2.-** 50 mM Tris pH 7,5, 20 mM DTT.

Se diluyeron 320  $\mu\text{L}$  de células a una concentración final de 0,3  $\text{OD}/\text{mL}$  utilizando 7,68 mL de cada condición reductora, para comparar el rendimiento de liticasa en ambos tampones. Se alicuotaron 1 mL de células en medio reductor en 14 tubos de 1,5 mL (7

por condición; Eppendorf, EE. UU.). Se diluyó liticasa almacenada a 4 °C a una razón 1:100 y se añadieron las cantidades indicadas en la tabla 3.

**Tabla 3. Condiciones de digestión con liticasa**

Condición	Liticasa 1:100 (µL)	Liticasa (µL)
Control	0	-
1	2	-
2	5	-
3	10	-
4	20	-
5	50	-
6	-	1
7	-	10

Se mezclaron rápidamente los tubos mediante agitador *vortex* y se incubaron por 30 min a 30 °C en estufa, mezclando por inversión a los 15 min para evitar la sedimentación de las células. Luego, se midió el OD<sub>600</sub> de cada tubo (espectrofotómetro Jenway) y se calculó el porcentaje de reducción en el OD en comparación a la condición control. Se realizó el cálculo de actividad enzimática de liticasa a partir de la condición más cercana a una reducción de OD del 50%.

#### **4.2.8.- Purificación de la fracción microsomal enriquecida**

Se purificó el translocón Sec61 de levadura para su adhesión a esferas de poliestireno recubiertas de anticuerpos anti-Sec61. El primer paso para la purificación del translocón es la obtención de microsomas: fragmentos del retículo endoplasmático que presentan las mismas proteínas, tanto de membrana como internas, que el organelo completo (**Palade & Siekevitz, 1956**). Se realizaron dos purificaciones de microsomas utilizando el método descrito por Lyman y Schekman (**Lyman & Schekman, 1997**).

La cepa de levadura *S. cerevisiae* RSY 1255, donada amablemente por el laboratorio del Dr. Randy Schekman (UC Berkeley MCB), posee una cola de histidina 6xHis-*tag* en el extremo C-terminal de las proteínas Sec61 y Sec63, para su purificación por columna de afinidad. Se inocularon 50 mL de medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona,

2% glucosa) con levadura y se incubaron a 30 °C, 200 rpm, por toda la noche en una incubadora con agitación orbital. Al día siguiente el cultivo se encontró saturado, en un rango de OD<sub>600</sub> extrapolado entre 2 y 3 (espectrofotómetro Jenway). A partir de éste, se inocularon 500 mL de medio YPD a un OD<sub>600</sub> inicial de 0,02 y se incubaron a 30 °C, 200 rpm por 14 h, hasta un OD<sub>600</sub> final de 2,4. Se inocularon 6 L de medio YPD divididos en cuatro matraces de 1,5 L. Para la inoculación, se añadieron 125 mL del medio a OD<sub>600</sub> = 2,4 a cada matraz, para un OD<sub>600</sub> inicial de 0,2. Los 6 L fueron incubados a 30°C y 200 rpm durante 5 h, hasta que cada matraz alcanzara un OD<sub>600</sub> cercano a 1. Las células fueron centrifugadas a una fuerza centrífuga relativa (RCF) de 4.080 a 4 °C por 20 min (centrífuga Sorvall, rotor GSA). Se pesaron las botellas de centrífuga (Nalgene, EE. UU.) vacías y con el precipitado una vez descartado el sobrenadante, para calcular el peso celular obtenido. Se resuspendieron los precipitados con 150 mL de tampón 100 mM Tris pH 9,4 y 10 mM DTT. Se incubaron las células en tampón por 10 min con agitación orbital suave a temperatura ambiente, y fueron precipitadas nuevamente según lo descrito con anterioridad. Las levaduras fueron resuspendidas en 150 mL de tampón de liticasa (0,7 M sorbitol, 0,75 x medio YP, 10 mM Tris pH 7,5 y 1mM DTT). Se obtuvieron esferoplastos (levaduras sin pared celular) añadiendo 10,5 mL de liticasa recombinante 25,2 U/μL e incubando a 30 °C por 30 min. Los esferoplastos fueron centrifugados a 4.400 RCF a 4 °C por 10 min (Centrífuga Hettich, rotor 1620A) y se resuspendieron en frío con 15 mL de tampón 2xJR (0,4 M sorbitol, 100 mM KOAc, 4 mM EDTA, 40mM HEPES pH 7,4, 2 mM DTT y 2 mM PMSF). Se le realizó un proceso de congelamiento rápido con nitrógeno líquido y fueron guardados a -80 °C.

Al día siguiente, los esferoplastos fueron descongelados y añadidos un cóctel de inhibidores de proteasas y poder reductor (3 μg/mL leupeptina, 1 mM PMSF y 3 mM DTT). Los esferoplastos fueron homogenizados a 2.800 rpm con un homogeneizador Potter-Elvehjem conectado a un taladro y centrifugados a 1.070 RCF (fuerza centrífuga relativa), 4 °C, por 10 min para precipitar los restos celulares y recuperar el sobrenadante, en donde se encuentran los microsomas. Se llevó a cabo una ultracentrifugación a 26.700 RCF (ultracentrífuga Beckman, rotor 90 Ti) para precipitar las membranas donde se encuentran los microsomas y descartar el sobrenadante con contaminantes de bajo peso molecular. Se resuspendieron los microsomas en 6 mL de tampón B88.

Para separar la fracción microsomal enriquecida, se realizó una centrifugación por gradiente de sacarosa. La gradiente se realizó añadiendo 1 mL de tampón de gradiente (20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM KOAc, 2 mM EDTA), con 1,5 M de sacarosa, seguido de 1 mL de tampón de gradiente con 1,2 M de sacarosa. Se añadieron 3 mL de extracto de membranas a cada tubo y se centrifugó a una fuerza media de 152.000 RCF (ultracentrífuga Beckman, rotor SW 55 Ti) a 4 °C por 1 h. Se recuperó por aspiración la banda correspondiente a la fracción microsomal, utilizando una bomba de vacío y una manguera de silicona conectada a una punta de pipeta recortada. El volumen recuperado fue diluido en 14 mL de tampón B88 y precipitado a 26.700 RCF (ultracentrífuga Beckman, rotor 90 Ti) a 4 °C por 10 min. Se resuspendieron los microsomas en 1 mL de tampón B88. Se recuperó una alícuota de 5 µL, la cual fue diluida en 1 mL de detergente SDS 2% para su cuantificación. Se cuantificó la cantidad total de proteínas obtenidas a partir de la alícuota mediante el método de absorbancia a 280 nm en espectrofotómetro.

#### **4.2.9.- Ensayo de protección y glicosilación de PpaF utilizando fracciones microsomales**

Para corroborar la actividad de translocación de los microsomas, se llevaron a cabo ensayos de protección y glicosilación utilizando PpaF silvestre (**Lyman & Schekman, 1995**). En primer lugar, se prepararon mezclas de microsoma estándar de 120 µL para los ensayos (4,34 mg/mL microsoma, 2 mM ATP, 0,1 mM GDP-manosa, tampón B88). Luego, se incubaron tubos con 3 µM finales de PpaF por 1 h a 20 °C en presencia (10 µL) o ausencia de mezcla microsomal, llevados a un volumen final de 40 µL con tampón B88. Se frenó la reacción rápidamente en hielo y se añadieron 1,5 µL de tripsina a 5 mg/mL para una condición, y 1,5 µL tripsina 5 mg/mL + 1 µL Tritón X-100 para otra, incubando por 30 min en hielo (ver tabla 4). La enzima tripsina digiere toda la proteína que se encuentra fuera de los microsomas una vez terminada la incubación (el microsoma protege las proteínas en su interior), y el detergente Tritón X-100 desarma las membranas microsomales, permitiendo a tripsina tener acceso a degradar toda la proteína. Para detener la digestión, se añadieron 4 µL de inhibidor SBTI 5 mg/mL a cada tubo con tripsina. Finalmente, se observó la presencia de bandas, correspondientes a PpaF glicosilada y a PpaF protegida de la digestión enzimática, mediante *Western blot* con anticuerpo primario Anti-PpaF, con análisis posterior por medio de software ImageJ (NIH, EE. UU.).

**Tabla 4. Condiciones para los ensayos de translocación de PpaF con fracciones microsomales obtenidas.**

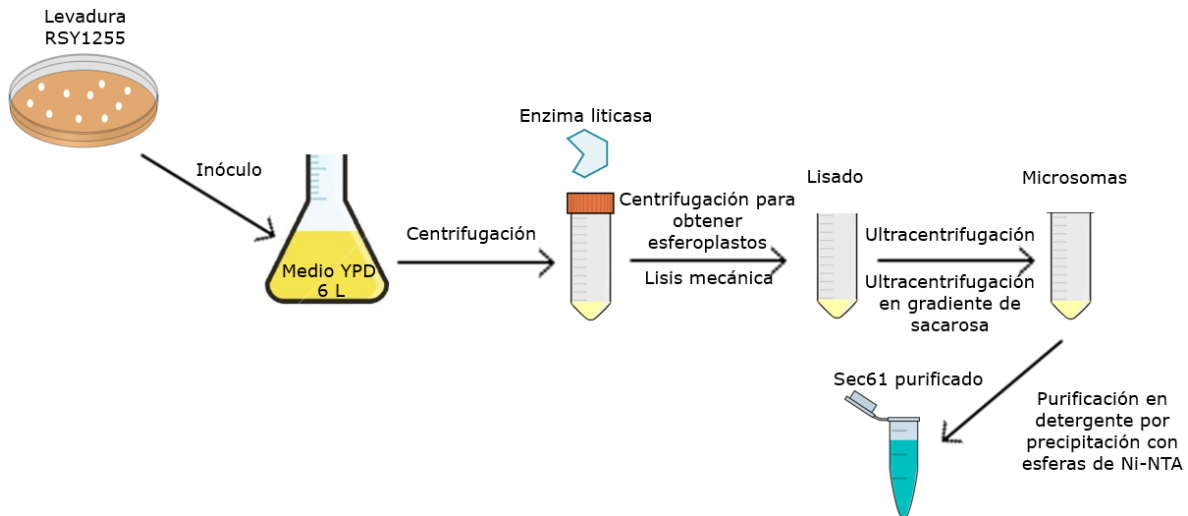
	PpaF	PpaF	Microsomias sin PpaF			Microsomias y PpaF		
	-	+ Trip	-	+ Trip	+ Trip + Triton	-	+ Trip	+ Trip + Triton
<b>B88 1X</b>	38 µL	38 µL	18 µL	18 µL	18 µL	18 µL	18 µL	18 µL
<b>Mezcla microsomas</b>	-----	-----	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
<b>PpaF (61.2 µM)</b>	2 µL	2 µL	-----	-----	-----	2 µL	2 µL	2 µL
<b>Vol. final</b>	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL

Las distintas condiciones permiten observar translocación mediante glicosilación de PpaF y protección frente a digestión por tripsina. **Trip:** tripsina.

#### **4.2.10.- Purificación del translocón Sec61 con complejo Sec a partir de microsomas**

Para la purificación de translocón a partir de microsomas, se diluyó la fracción microsomal a una concentración de proteína de 12 mg/mL utilizando tampón B88 con 0,4 M urea, 0,5% p/v digitonina, 1 mM ATP, 40 mM fosfocreatina y 0,2 mg/mL creatina quinasa, y se incubó por 25 min en hielo con agitación orbital. Se centrifugó a 40.200 rpm (Ultracentrífuga Beckman, rotor 90Ti) por 15 min a 4 °C. Se incubó el sobrenadante con 500 µL de esferas de Ni-NTA. Luego, se centrifugó a 5.000 RCF por 1 min a 4 °C, recuperando el precipitado. Se lavó la mezcla 4 veces con 500 µL de tampón con 15 mM imidazol pH 7,0 incubando por 4 min, y posteriormente centrifugando a 5.000 RCF durante 1 min a 4 °C. Se eluyó la mezcla con 200 µL de tampón con 250 mM imidazol pH 7,0 incubando por 15 min a 4 °C. Se filtró la muestra en tubos con acetato de celulosa 0,22 µm (Corning, EE. UU.) y se centrifugó a 9.614 RCF durante 5 min a 4 °C. Se intercambié el tampón para eliminar el imidazol utilizando tubos Amicon Ultra 0,5 mL con filtro 10k. Se diluyó la muestra hasta alcanzar los 500 µL permitidos por el tubo, utilizando tampón sin imidazol. Se centrifugó a 9.614 RCF durante 30 min aproximadamente (hasta volver a alcanzar los 100 µL de volumen). Se realizó este lavado 4 veces, hasta obtener una concentración teórica de imidazol del orden nanomolar. Se corroboró la presencia de Sec61, Sec63, Sec72 y BiP mediante técnica *Western blot*.





**Figura 8. Pasos de purificación de translocón Sec61.** Se aisló una colonia de la levadura *S. cerevisiae* RSY1255, a partir de la cual se inocularon 6 L de medio YPD. Se concentraron las células mediante centrifugación y se trataron con la enzima liticasa. Los esferoplastos resultantes fueron lisados de forma mecánica y se obtuvieron los microsomas purificados mediante dos procesos de ultracentrifugación. Finalmente, para obtener el translocón, se purificó mediante precipitación con esferas de Ni-NTA en presencia de detergente digitonina.

#### 4.2.11.- Funcionalización de esferas de poliestireno

Se funcionalizaron microesferas de poliestireno de 3,1  $\mu\text{m}$  recubiertas de proteína G (Spherotech, EE. UU.) con anticuerpos anti-Sec61 (policlonales de conejo, donados gentilmente por el laboratorio del Dr. Randy Schekman, UC Berkeley MCB), mediante un método de ligación covalente (**Smith et al., 1992**). En primer lugar, se centrifugó 1 mL de solución con microesferas a 1.000 RCF por 2 min para precipitar, descartando luego el sobrenadante. Se realizó un primer lavado resuspendiendo en 1 mL de PBS pH 7,4 y se centrifugó nuevamente a la misma velocidad. Se resuspendió el precipitado en 1 mL de PBS pH 7,0 y se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de anticuerpo en concentración 1 mg/mL de proteína total (se asumió una pureza del 20% al ser anticuerpos policlonales, es recomendable una concentración de 0,2 mg/mL para anticuerpos monoclonales). Se disolvieron 50 mg de pimelimidato de dimetilo (DMP; Thermo-Fisher) en 1 mL de tampón de entrecruzamiento (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 100 mM NaCl, pH 8,5) e inmediatamente después se agregaron 30  $\mu\text{L}$  a la solución con microesferas y anticuerpo. Se incubó la reacción en oscuridad y con agitación orbital durante 1 h. A continuación, se centrifugó a 1.000 RCF por 2 min y se descartó nuevamente el sobrenadante, resuspendiendo luego

en 1 mL de Tris 2 M sin ajustar pH. Se incubó por 2 h con agitación suave. Se lavó tres veces con PBS pH 7,0 según lo previamente descrito, hasta llegar a pH neutro medido con papel pH, y se adicionaron 5  $\mu$ L de azida de sodio 1 M para su almacenamiento a 4 °C.

#### **4.2.12.- Preparación de muestras para pinzas ópticas *in situ***

Se siguió un protocolo basado en Cecconi y cols. (**Cecconi et al., 2008**). Brevemente, el día del experimento en pinzas ópticas se incubaron las construcciones de PpaF-ADN purificadas (concentración final de incubación 0,32 nM de ADN) con 2,5  $\mu$ L de microesferas de poliestireno de 2,1  $\mu$ m de diámetro recubiertas con estreptavidina (Spherotech, EE. UU.; **Chu & Kron, 1990**) y 7  $\mu$ L de tampón de pinzas ópticas (PO; compuesto de tampón B88 con 1 M urea y 0,02 M n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido) preparado el mismo día. La concentración de n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido se encuentra al límite de la concentración micelar crítica de 0,023 M a 100 nM de NaCl (**Chattopadhyay & London, 1984**).

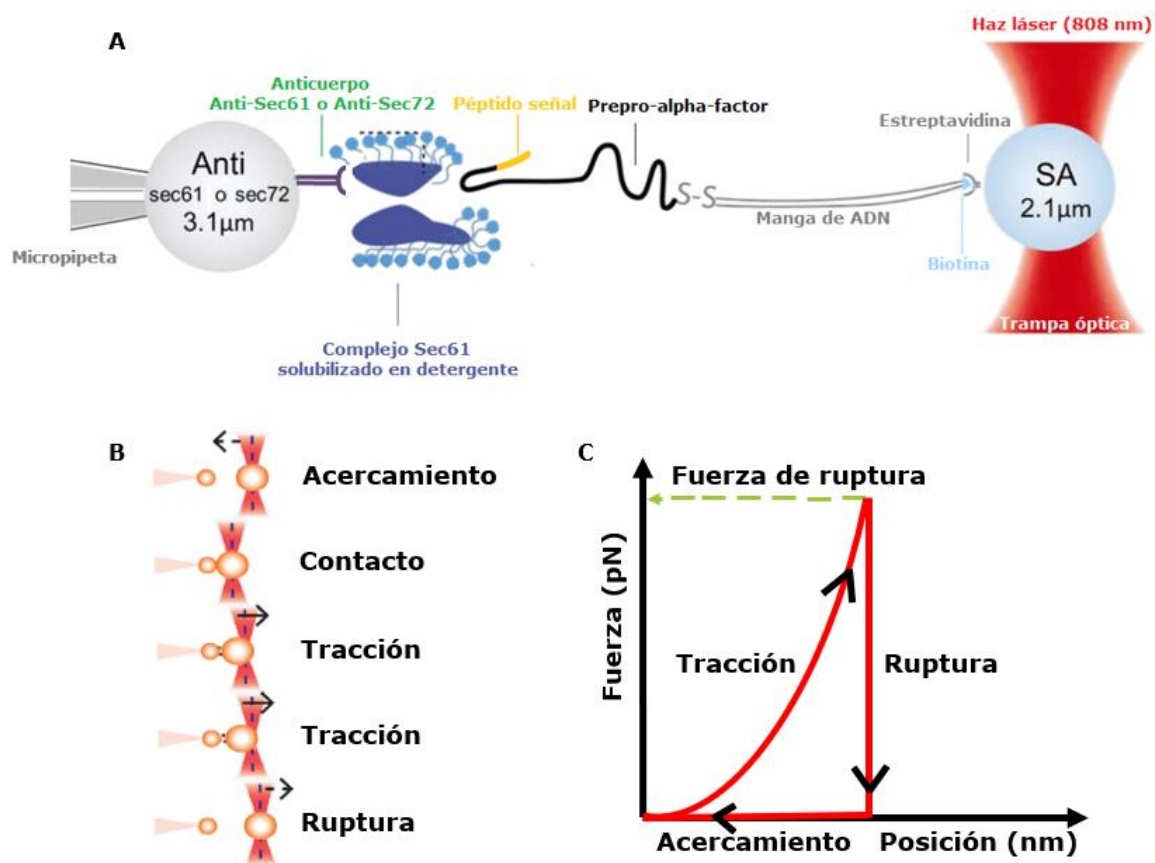
En paralelo, se diluyó el translocón solubilizado con tampón de translocón, hasta una concentración de 0,24 mg/mL. Se incubaron 0,5  $\mu$ L de translocón (concentración de incubación 12 ng/mL) junto con 2,5  $\mu$ L de microesferas con anticuerpo anti-Sec61 y 7  $\mu$ L de tampón PO.

Las muestras fueron incubadas durante 15 min en hielo, y luego se diluyeron a 1 mL utilizando tampón PO. Se demostró que la concentración final de las proteínas, del orden femtomolar, es suficiente para obtener eventos particulares, llamados trazas, característicos para interacciones a nivel de molécula única (**Burgos-Bravo et al., 2018**).

#### **4.2.13.- Ensayos de interacción de molécula única mediante espectroscopía de fuerzas utilizando pinzas ópticas**

Los ensayos de interacción entre PpaF y Sec61 a nivel de molécula única se realizaron en un equipo *miniTweezers* (**Bustamante & Smith, 2006, 2007**) según el método descrito por Burgos-Bravo (**Burgos-Bravo et al., 2018**). El equipo posee una trampa óptica formada por dos láseres de 845 nm, que permite el manejo de microesferas de poliestireno. Los experimentos se realizaron en una cámara de flujo laminar con una

micropipeta de vidrio en su interior. Para medir interacción entre el translocón Sec61 y PpaF, se fijó por succión una microesfera de 3,2  $\mu\text{m}$  de diámetro, unida al translocón, a la micropipeta. Luego, se atrapó con la trampa una segunda microesfera de 2,1  $\mu\text{m}$  de diámetro, unida a la quimera PpaF-ADN y se guió para interactuar con la microesfera atrapada en la micropipeta (ver figura 9). Las esferas se pusieron en contacto para promover la interacción entre las moléculas. Al pasar un tiempo suficiente para que ocurra interacción ( $\sim 2$  s), se separaron las microesferas a una velocidad de 100 nm/s, con una dureza de trampa de 0,1 pN/nm registrando la fuerza de ruptura de la interacción. A partir de las mediciones, se construyeron histogramas de fuerza de ruptura.



**Figura 9. Diseño experimental de espectroscopía de fuerzas en pinzas ópticas.** En **A)** se muestra la configuración experimental (no a escala). Fija a una micropipeta por succión, se encuentra una esfera de poliestireno recubierta de anticuerpos anti-Sec61 con el translocón solubilizado en detergente. Capturada en la trampa láser móvil se encuentra una esfera recubierta de estreptavidina, la cual interacciona con la quimera PpaF-ADN-biotina que se desea estudiar. En

**B)** se observan los pasos del experimento, mientras que en **C)** el respectivo gráfico de posición contra fuerza que se obtiene en cada evento de interacción. Las esferas son acercadas periódicamente y puestas en contacto, durante un tiempo estimado de 2 s. Luego, las esferas son separadas a una velocidad constante de 100 nm/s (tracción), momento en el cual se observa una resistencia, advertida como un aumento en el eje de la fuerza, si es que hubo interacción. A cierta distancia existe una ruptura de la interacción, la cual se observa como una súbita caída de la fuerza. Se registran los valores máximos de fuerza antes de la caída (fuerza de ruptura). Figura adaptada de **Burgos-Bravo y cols., 2017**.

#### **4.2.14.- Análisis de datos de pinzas ópticas para obtener interacciones específicas entre PpaF y Sec61**

Para eliminar las interacciones inespecíficas (aquellas que no corresponden a PpaF-Sec61) del total de datos experimentales, se procesaron los datos de la forma descrita por Burgos-Bravo y cols. (**Burgos-Bravo et al., 2018**). Este método se basa en el Teorema de la Probabilidad Total:

$$P(F) = P(F|AB) \times P(AB) + P(F|\overline{AB}) \times P(\overline{AB}) \quad \text{Ecuación 1}$$

En esta expresión, **A** y **B** corresponden a las proteínas PpaF y Sec61, **AB** representa la interacción específica entre ambas proteínas y  **$\overline{AB}$**  a todo el resto de las interacciones inespecíficas del experimento. **P(F)** es la función de densidad de probabilidad (PDF) de las fuerzas de ruptura en el caso de que haya tanto interacciones específicas como inespecíficas, y es igual a la suma ponderada de las PDF de fuerza de ruptura de ambas interacciones, **P(F|AB)** y **P(F| $\overline{AB}$ )**, multiplicadas por la probabilidad de la interacción, **P(AB)** y **P( $\overline{AB}$ )** respectivamente. Las PDF son funciones continuas que asignan la probabilidad de que una variable aleatoria caiga en un determinado rango de valores, en vez de en un valor en particular. Si asumimos que ambos eventos son mutuamente excluyentes (una fuerza de ruptura no puede pertenecer a una interacción específica e inespecífica a la vez) y complementarios (solo se pueden observar interacciones específicas o inespecíficas), podemos realizar el siguiente reemplazo:

$$P(\overline{AB}) \equiv 1 - P(AB) \quad \text{Ecuación 2}$$

Dado que los datos experimentales son discretos, se reinterpretan las **ecuaciones 1** y **2** en base a los histogramas obtenidos en vez de las PDF. En términos prácticos, definimos **h(F) = P(F)**, donde **h(F)** corresponde al histograma de fuerzas de ruptura

experimentales obtenido al estudiar las mutantes de PpaF, e incluye fuerzas tanto específicas como inespecíficas, lo que llamaremos «histograma antes de filtrar»;  $f_{\overline{AB}}(F) = P(F|\overline{AB})$  es el histograma de fuerzas de ruptura inespecíficas, y se obtiene experimentalmente con los datos del control negativo;  $f_{AB}(F) = P(F|AB)$  es el histograma teórico de fuerzas de ruptura específicas, el cual se desea obtener, llamado «histograma filtrado»; y  $\alpha = P(AB)$ , la probabilidad de que una interacción sea de tipo específica. Reemplazando  $\alpha$  en la **ecuación 2** y  $h(F)$ ,  $f_{\overline{AB}}(F)$ , y  $f_{AB}(F)$  en la **ecuación 1** se obtiene:

$$h(F) = \alpha \times f_{AB}(F) + (1 - \alpha) \times f_{\overline{AB}}(F) \quad \text{Ecuación 3}$$

Utilizando el teorema de Bayes se pueden obtener expresiones para las probabilidades de encontrar interacciones específicas y no específicas en un intervalo de fuerzas de ruptura entre  $F$  y  $F+dF$ ,  $P(AB|F)$  y  $P(\overline{AB}|F)$ , respectivamente:

$$P(AB|F) = \alpha \frac{f_{AB}(F)}{h(F)} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$P(\overline{AB}|F) = (1 - \alpha) \frac{f_{\overline{AB}}(F)}{h(F)} \quad \text{Ecuación 5}$$

Teniendo el histograma antes de filtrar,  $h(F)$ , y el histograma de fuerzas inespecíficas,  $f_{\overline{AB}}(F)$ , se procesaron los datos utilizando el programa MATLAB para obtener el histograma filtrado de fuerzas específicas,  $f_{AB}(F)$ . Para esto, las funciones de distribución acumuladas (CDF) experimentales fueron ajustadas a distintas distribuciones de la familia Generalizada de Valores Extremos (GEV, por sus siglas en inglés; **Chervenkov & Malcheva, 2018**), ya que las fuerzas de ruptura son valores extremos de las fuerzas de interacción, y no siguen una distribución gaussiana. De esta familia, la distribución de Fréchet fue la que mejor ajustó a los datos experimentales (para mayor detalle, revisar material suplementario de **Burgos-Bravo et al., 2018**). El parámetro  $\alpha$  se obtiene gracias al ajuste, y se utiliza para filtrar las alturas de los histogramas experimentales de forma ponderada.

En este trabajo, se filtraron los datos de los experimentos con PpaF Tyr165Cys, la cual posee el péptido señal silvestre y se espera que interaccione correctamente con el translocón, y PpaF Ala13Glu/Tyr165Cys, con la mutación de un aminoácido hidrofóbico

por uno de carga negativa en su péptido señal que causa una deficiencia en translocación.

#### 4.2.15.- Modelo de Dudko-Hummer-Szabo y modelo de Bell

Una vez obtenidos los datos de fuerzas de ruptura específicas, se normalizaron los histogramas para ajustar al modelo de Dudko-Hummer-Szabo (DHS; **Dudko et al., 2008**). Se calcularon los tiempos de vida de la interacción en dependencia de la fuerza,  $\tau(F)$ , de la siguiente manera:

$$\tau(F_0 + [k - 1/2]\Delta F) = \frac{(h_k/2 + \sum_{i=k+1}^N h_i)\Delta F}{h_k \dot{F}(F_0 + [k - 1/2]\Delta F)} \quad \text{Ecuación 6}$$

En la ecuación,  $k$  es un número entero, con valores 1, 2, ..., N-1, N, que indica la posición de una barra en el histograma.  $F_0$  es la fuerza mínima registrada y  $\Delta F$  es el ancho de las barras del histograma. Cada barra tiene una altura  $h_k$ , correspondiente al número de cuentas en la barra  $k$ ,  $C_k$ , normalizada de tal forma que el área total sea igual a 1:  $h_k = C_k/C_{Tot}\Delta F$ , con  $C_{Tot}$  siendo el número total de cuentas.  $\dot{F}$  es el cambio de fuerza en el tiempo, parámetro llamado comúnmente como tasa de carga. Al modelar las mangas de ADN como una «varilla elástica» o «cadena vermiforme», la tasa de carga corresponde a:

$$\dot{F}(F) = v \left[ \frac{1}{k_s} + \frac{2\beta L l_p (1 + \beta F l_p)}{3 + 5\beta F l_p + 8(\beta F l_p)^{5/2}} \right]^{-1} \quad \text{Ecuación 7}$$

En donde  $v$  es la velocidad constante del experimento, 100 nm/s. La constante de resorte de las pinzas ópticas,  $k_s$ , tiene un valor de 0,1 pN/nm.  $L$  es el largo de contorno, o largo extremo a extremo, de la manga de ADN, en este caso 180 nm.  $l_p$  corresponde al largo de persistencia, vale decir, la longitud máxima que una cadena puede permanecer rígida; en caso del ADN de doble hebra tiene un valor promedio de 39 nm.  $\beta = (k_B T)^{-1}$  es conocido como el beta termodinámico, y es el inverso de la energía térmica. El experimento se realizó a una temperatura de 296 K.

$$\tau(F) = \tau_0 \left( 1 - \frac{\nu F \Delta x^\ddagger}{\Delta G^\ddagger} \right)^{1-1/\nu} e^{-\beta \Delta G^\ddagger [1 - (1 - \nu F \Delta x^\ddagger / \Delta G^\ddagger)^{1/\nu}]}$$

**Ecuación 8**

La **ecuación 8** permite calcular tres parámetros a fuerza cero: el tiempo de vida de la interacción ( $\tau_0$ , cuyo inverso corresponde a la constante cinética de disociación,  $k_{off}$ ), la diferencia de energía libre al estado de transición ( $\Delta G^\ddagger$ , que se entiende como la barrera energética para el proceso de disociación) y la distancia al estado de transición ( $\Delta x^\ddagger$ , la cual se correlaciona con el número de interacciones que se deben romper para separar ambas proteínas). El factor de escalamiento  $\nu$  puede ser ajustado a valores  $\nu = 1/2$  para un oscilador armónico con un valle tipo cúspide,  $\nu = 2/3$  para un potencial con términos lineales y cúbicos, y  $\nu = 1$  para recuperar la ecuación empírica de Bell (**Bell, 1978**). En este último caso, se simplifica la ecuación hasta obtener:

$$\tau(F) = \tau_0 e^{-\beta F \Delta x^\ddagger}$$

**Ecuación 9**

En consecuencia, si el ajuste es perfectamente exponencial (como en la **ecuación 9**), no es posible obtener valores de  $\Delta G^\ddagger$  de los datos obtenidos.

Los ajustes se realizaron mediante un método de mínimos cuadrados no lineales. Para cuantificar la diferencia entre los parámetros ajustados por los modelos, se realizó una prueba t de Student de dos colas para dos muestras independientes. Se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo. Se calculó el estadístico t según la ecuación:

$$t = \frac{\beta_1 - \beta_2}{\sqrt{SE_1^2 + SE_2^2}}$$

**Ecuación 10**

En donde  $\beta_i$  es el parámetro ajustado ( $\tau_0$ ,  $\Delta x^\ddagger$ ,  $\Delta G^\ddagger$ ) de la condición «i», y **SE** es el error estándar del parámetro  $\beta_i$ . En el denominador de la **ecuación 10** se aproxima el error estándar de la diferencia como la raíz de la suma de cuadrados de los errores individuales. Esta aproximación es válida cuando el número de datos entre ambos grupos es cercano (**GraphPad, 2016**).

## **5.-RESULTADOS**

### **5.1.-Objetivo específico 1: Purificación de *prepro-alpha-factor* (PpaF) Tyr165Cys y Ala13Glu/Tyr165Cys.**

#### **5.1.1.- Diseño y secuenciación de plásmidos de PpaF**

El gen que codifica para la proteína recombinante *prepro-alpha-factor* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra inserto en el plásmido pMAH1 (**Bush et al., 1991**). Sin embargo, el gen se encontraba parcialmente secuenciado, por lo que no se tenía conocimiento de modificaciones inesperadas que la secuencia pudiera presentar.

Se diseñaron partidores de secuenciación a partir de un segmento interno del gen de *prepro-alpha-factor* de *S. cerevisiae*: MF(ALPHA)1 (**NCBI gene ID: 855914**), con el fin de reconstruir la secuencia completa del gen insertado en las copias del plásmido pMAH1 presentes en el laboratorio. Se secuenciaron utilizando el servicio *Sequetech DNA Sequencing Service* (Sequetech, EE. UU.): se confirmó la presencia de PpaF silvestre y PpaF Tyr165Cys, mutación que permite la unión covalente de mangas de ADN para experimentos en pinzas ópticas (ver figura 10). Se corroboró, además, en ambos genes, la presencia del marcador *6xHis-tag*; cola de seis residuos de histidina colocadas en el extremo C-terminal para permitir la purificación por afinidad con columna de níquel.

Se llevó a cabo una mutagénesis de sitio dirigido por PCR del plásmido pMAH1, con el gen de PpaF Tyr165Cys, utilizando los partidores diseñados. Se clonó el plásmido resultante en *E. coli* XL10, luego fue purificado y se corroboró la mutación GCA por GAA (Ala13Glu) mediante el servicio *Sequetech DNA Sequencing Service* (Sequetech, EE. UU.).



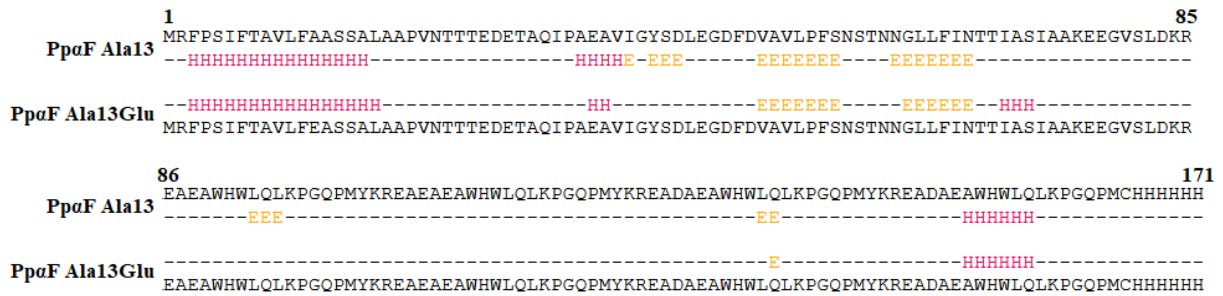
<b>Mating factor alpha 1</b>	1	MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYLDLEGDFDV	50
<b>Prepro-alpha-factor (pMAH1)</b>	1	MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDV	50
<b>Mating factor alpha 1</b>	51	AVLPFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGVSLDKREAEAWHWLQLKPGQP	100
<b>Prepro-alpha-factor (pMAH1)</b>	51	AVLPFSNSTNNGLLFINTTIIAS-----	72
<b>Mating factor alpha 1</b>	101	MYKREADAEAWHWLQLKPGQPMYKREADAEAWHWLQLKPGQPMYKREADA	150
		:	
<b>Prepro-alpha-factor (pMAH1)</b>	73	MYKREAEAEAWHWLQLKPGQPMYKREADAEAWHWLQLKPGQPMYKREADA	122
<b>Mating factor alpha 1</b>	151	EAWHWLQLKPGQPMY-----	165
<b>Prepro-alpha-factor (pMAH1)</b>	123	EAWHWLQLKPGQPMCHHHHHH	143

**Figura 10. Alineamiento de las secuencias de las proteínas MF(ALPHA)1 de *S. cerevisiae* y PpaF Tyr165Cys codificada en el plásmido pMAH1.** El espacio sin alinear corresponde a la secuencia utilizada para los partidores de secuenciación, en rojo se observa la mutación Tyr165Cys (Y165C), y en el extremo C-terminal se encuentra la cola de histidina 6xHis-tag. El gen inserto en pMAH1 presenta además una variante natural Leu42Ser (L42S, en verde), la cual no debería afectar al experimento, ya que reemplaza un aminoácido en la región posterior al sitio de corte del péptido señal sin añadir sitios de glicosilación.

### 5.1.2.- Modelamiento de mutantes de PpaF no muestra cambios aparentes en la estructura secundaria del péptido señal

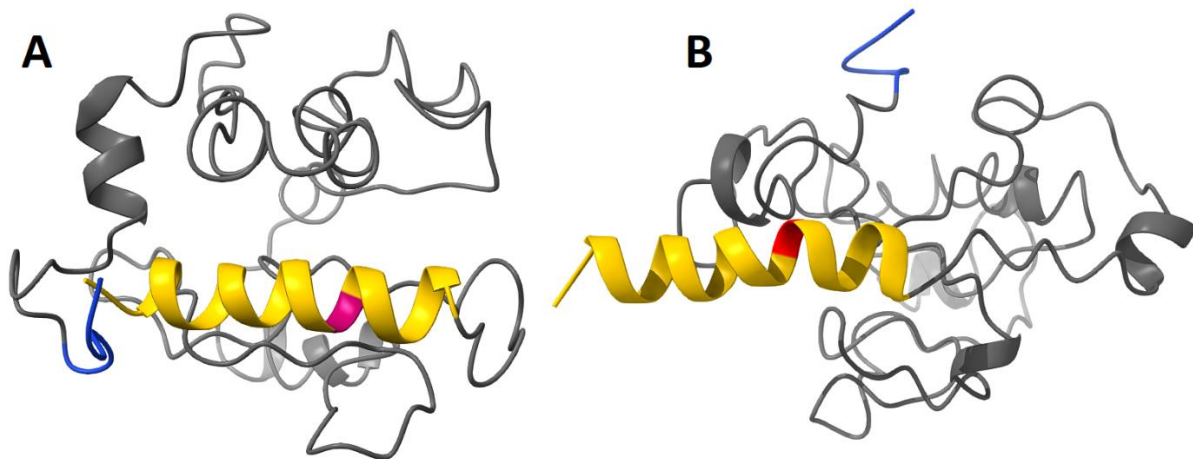
No existe, a la fecha, evidencia estructural de PpaF registrada en Banco de Datos de Proteínas (PDB, por sus siglas en inglés). Se realizaron predicciones de la estructura secundaria y terciaria de las mutantes de PpaF utilizadas en este trabajo, y de la proteína silvestre, en busca de cambios estructurales que pudieran afectar la interacción entre el SP y Sec61.

La predicción de estructura secundaria mediante el servidor JPred4 no mostró una diferencia importante en el SP de las distintas mutantes (PpaF Tyr165Cys y Ala13Glu/Tyr165Cys; ver figura 11), ni con el SP de la proteína silvestre (dato no mostrado). Se observa que la mayor parte de la secuencia después del SP se encuentra desestructurada.



**Figura 11. Comparación de estructuras secundarias de mutantes de PpaF.** En rojo (H): predicción de hélice alfa. En amarillo (E): predicción de estructura extendida, incluyendo hoja beta. Residuos 1-18 corresponden al péptido señal, el cual se encuentra mayoritariamente en forma de hélice en ambas proteínas.

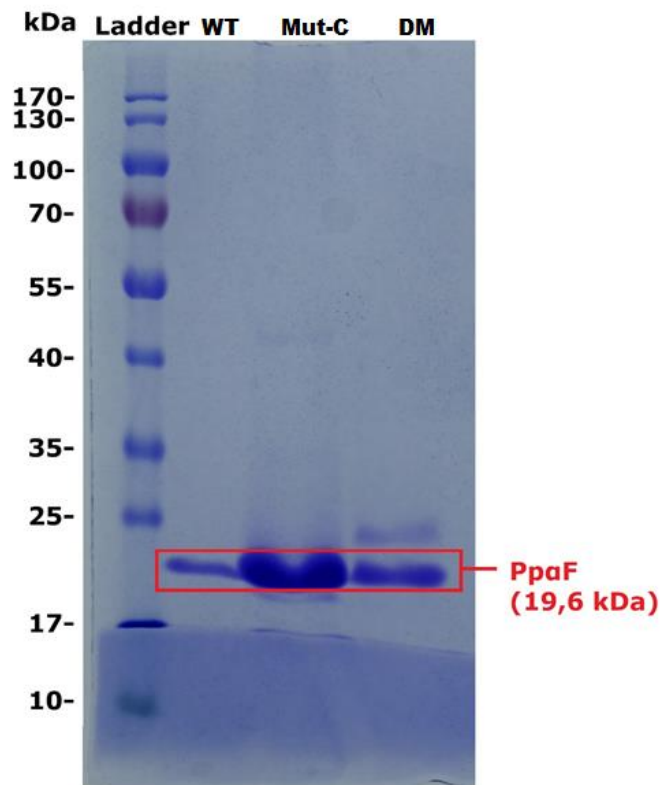
Para corroborar este resultado, se modeló la estructura tridimensional de las mutantes mediante los servidores I-TASSER (ver figura 12) y C-QUARK (dato no mostrado). Nuevamente, se observa que el SP silvestre de PpaF Tyr165Cys y el SP de la mutante Ala13Glu/Tyr165Cys poseen la misma estructura de hélice alfa entre los residuos 3-18. Ambos servidores concuerdan, además, en la baja proporción de estructura secundaria de estas proteínas.



**Figura 12. Modelamiento de la estructura tridimensional de las mutantes de PpaF.** En **A)** estructura de PpaF Tyr165Cys 6xHis. En **B)** estructura de PpaF Ala13Glu/Tyr165Cys 6xHis. En amarillo: péptido señal, correspondiente a los primeros 18 residuos. Se destacan los residuos Ala13 (magenta) y Glu13 (rojo). En azul: marcador de histidinas C terminal 6xHis-tag. C-scores: -4,62 y -4,35 respectivamente (valores típicos entre -5 y 2).

### 5.1.3.- Purificación e identificación de mutantes de PpaF

Se purificaron las proteínas PpaF silvestre, Tyr165Cys y Ala13Glu/Tyr165Cys, todas con marcador C-terminal 6XHis-*tag*, mediante una gradiente de imidazol de 5 a 250 mM en columna de níquel, a 8 M urea y con DTT como agente reductor para evitar la dimerización por puentes disulfuro entre las cisteínas. Esta purificación en un paso permitió obtener proteína de alta pureza (ver tabla 5). Se compararon los productos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE; ver figura 13).



**Figura 13. SDS-PAGE al 12% de los productos de purificación de PpaF.** Carriles denominados como PpaF silvestre (*wild type*, **WT**; Masa aparente = 21 kDa), mutante Tyr165Cys (**Mut-C**; Masa aparente = 20 kDa) y mutante Ala13Glu/Tyr165Cys (**dobles mutante**, **DM**; Masa aparente = 20 kDa). Se observan tres bandas dentro del rango de masa esperado para PpaF (19,6 kDa). El carril **DM** presenta además una banda de mayor masa (masa aparente = 25 kDa). Estándar de masa (**Ladder**) utilizado *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific, EE. UU.).

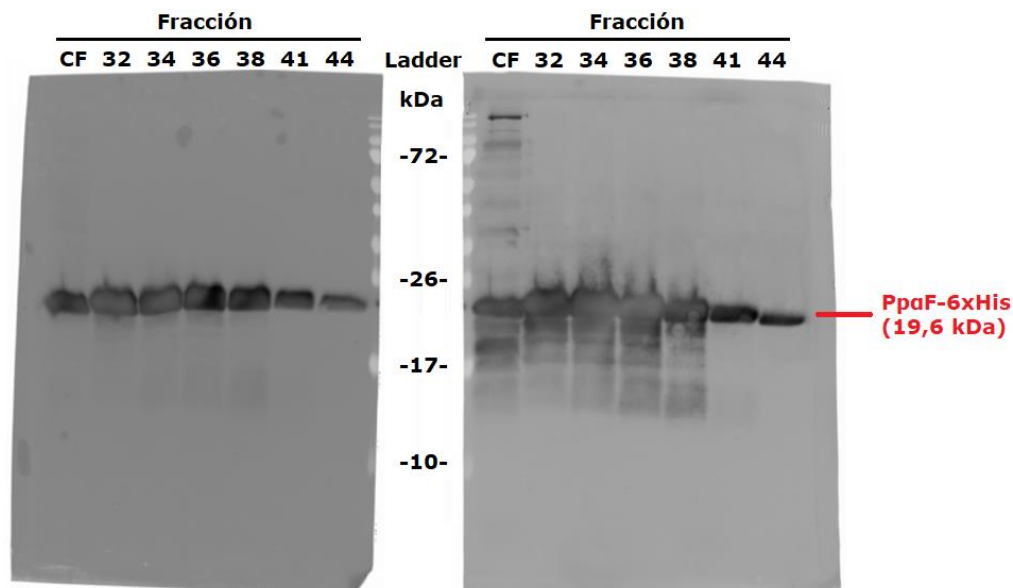
**Tabla 5. Concentraciones y pureza de las mutantes de PpaF.**

<b>Proteína</b>	<b>Volumen total (mL)</b>	<b>Concentración proteína total (mg/mL)</b>	<b>% de pureza en gel</b>	<b>Concentración (μM)</b>
<b>PpaF 6XHis-tag</b>	1	1,19	>99	61,2
<b>PpaF Tyr165Cys 6XHis-tag</b>	1	1,47	98	74,1
<b>PpaF Ala13Glu/Tyr165Cys 6XHis-tag</b>	0,5	1,06	82	44,6

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 μM fueron calculadas a partir de la masa teórica de estas mutantes (~19,5 kDa) y pureza.

Se confirmó la identidad de la proteína silvestre por electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado (técnica *Western blot*, figura 14). Las proteínas fueron concentradas mediante centrifugación con tubos con filtro de 10 kDa (Amicon, Merck Millipore, Alemania), ya que las mutantes tienen una masa de alrededor de 19,6 kDa.

Por último, se analizaron las muestras de las mutantes purificadas mediante espectrometría de masas con digestión enzimática. El fraccionamiento con digestión por tripsina logró corroborar los residuos 76-171, por lo que se observó la mutación Tyr165Cys necesaria para el experimento. Un análisis posterior con quimiotripsina detectó parcialmente el extremo N-terminal, excluyendo un segmento que contiene al residuo 13, donde se esperaba encontrar alanina o glutamato en ambas proteínas respectivamente.

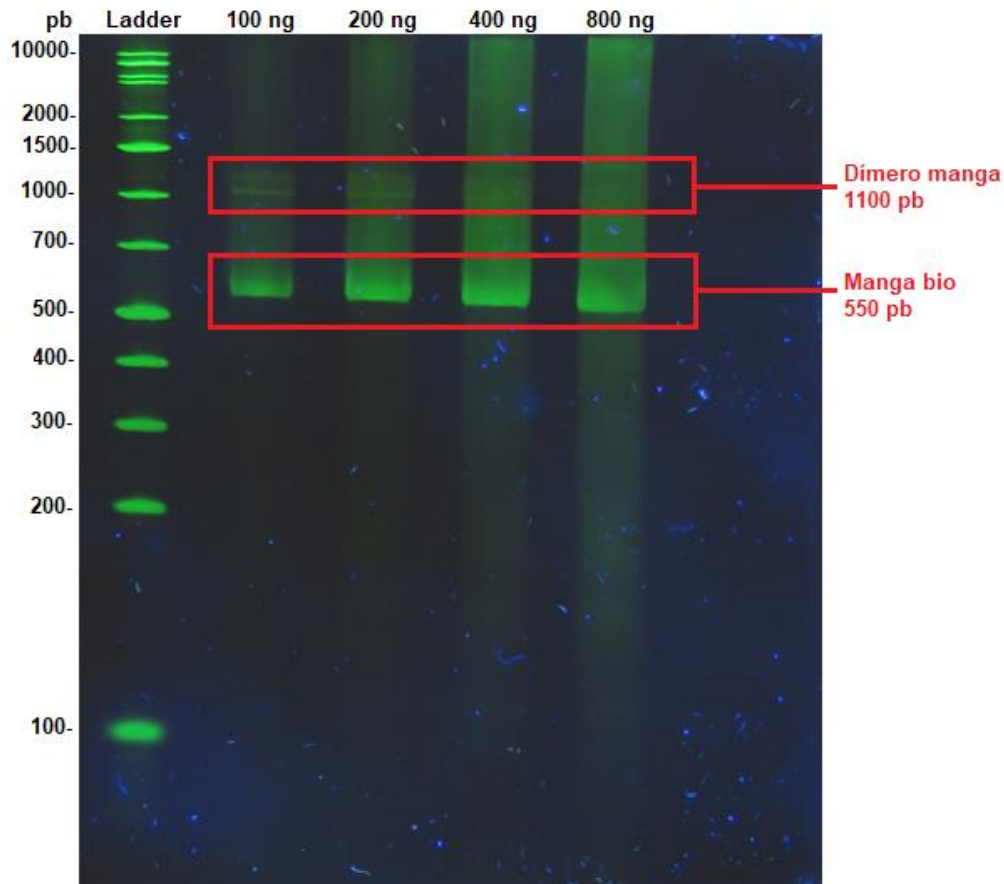


**Figura 14. Western blot de las fracciones eluidas en la purificación de PpaF silvestre.** **Izquierda:** Anticuerpo primario Anti-His 1:1000, secundario Anti-conejo 1:3000, 28 s de exposición a reacción quimioluminiscente (ECL). **Derecha:** anticuerpo primario Anti-PpaF 1:100, secundario Anti-conejo 1:3000, 1 min de exposición ECL. En ambos casos se observan bandas entre 17 y 26 kDa, rango esperado para PpaF silvestre con marcador 6xHis-tag C-terminal (19,6 kDa). Estándar de masa (**Ladder**) utilizado *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific, EE. UU.).

## 5.2.-Objetivo específico 2: Ligación de *prepro-alpha-factor* a mangas de ADN.

### 5.2.1.- Síntesis de mangas de ADN

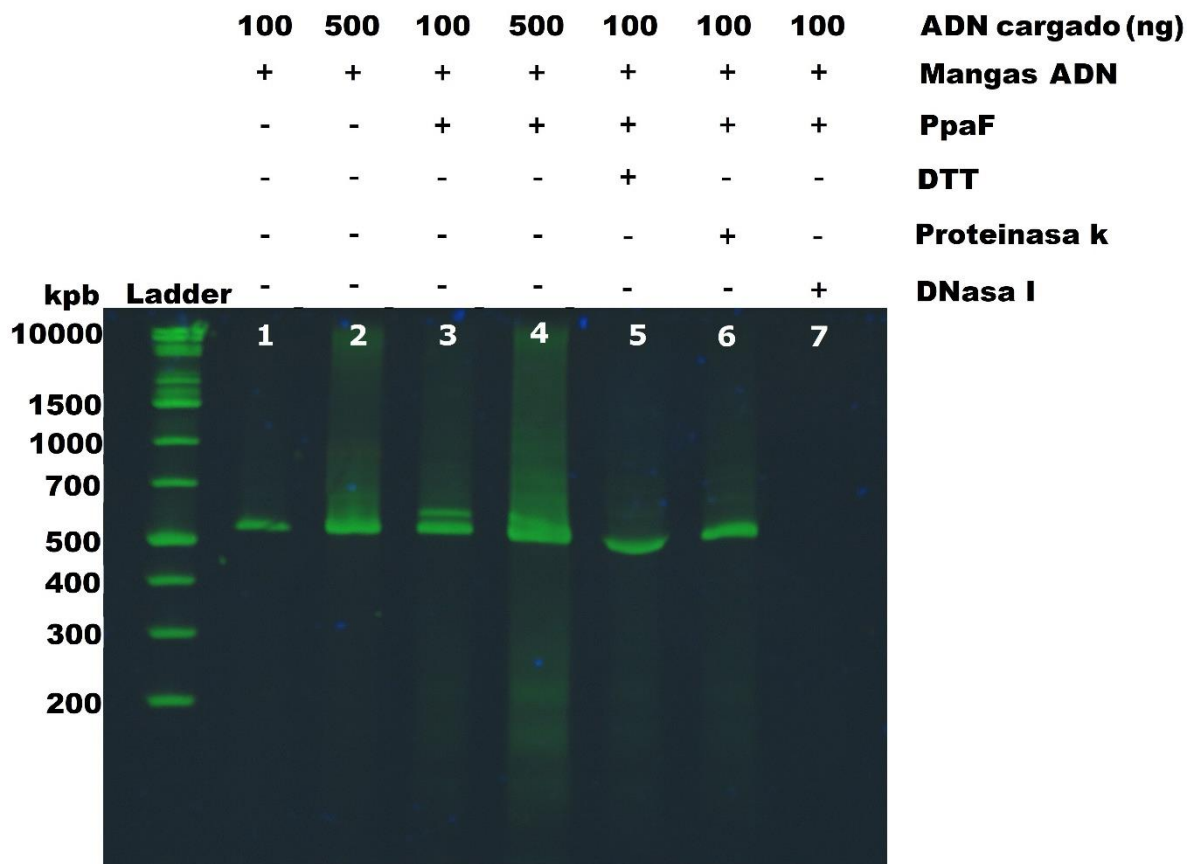
Para adherir las mutantes de PpaF a las esferas de poliestireno, se utilizaron mangas de ADN de 552 pares de bases. Éstas funcionan como espaciador y como estándar de fuerza, ya que sufren una deformación característica a 67 pN (**Smith et al., 1996**). Las mangas de ADN biotiniladas y tioladas fueron sintetizadas por PCR a partir de partidores químicamente modificados (ver punto 4.2.4). Se midió la concentración mediante razón de absorbancias a 260 y 280 nm con lector de placas Tecan, con una razón de absorbancias de 1,92. Se corroboró que el producto sintetizado fuera del tamaño correcto mediante electroforesis en gel de agarosa (ver figura 15).



**Figura 15. Gel de productos de síntesis de mangas de ADN.** Gel de poliacrilamida 6% nativo (sin SDS), 100 V por 1 h. Mangas de ADN se corrieron a 100, 200, 400 y 800 ng por pocillo, para estandarizar visualización del dímero. Tinción con Sybr Green I. 100 ng de ADN muestra resultado más claro. **Ladder:** estándar de tamaño molecular, en pares de bases de ADN (pb) *GeneRuler* 1 kb *DNA Ladder* (Thermo-Fisher, EE. UU.).

### 5.2.2.- Ligación covalente de PpaF-ADN

Para evitar la dimerización de las proteínas, se protegieron los grupos tiol de las mutantes de PpaF con 2,2-dipiridil disulfuro (DPS) y se ligaron a las mangas de ADN según el protocolo descrito por Cecconi y cols. (**Cecconi et al., 2008**), con leves modificaciones. Se corroboró la ligación mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida, con tinción utilizando el marcador fluorescente intercalante de ADN Sybr Green I (Invitrogen, EE. UU.; ver figura 16). Se corroboró la identidad de la quimera mediante *Western blot* con anticuerpo primario Anti-PpaF (dato no mostrado).



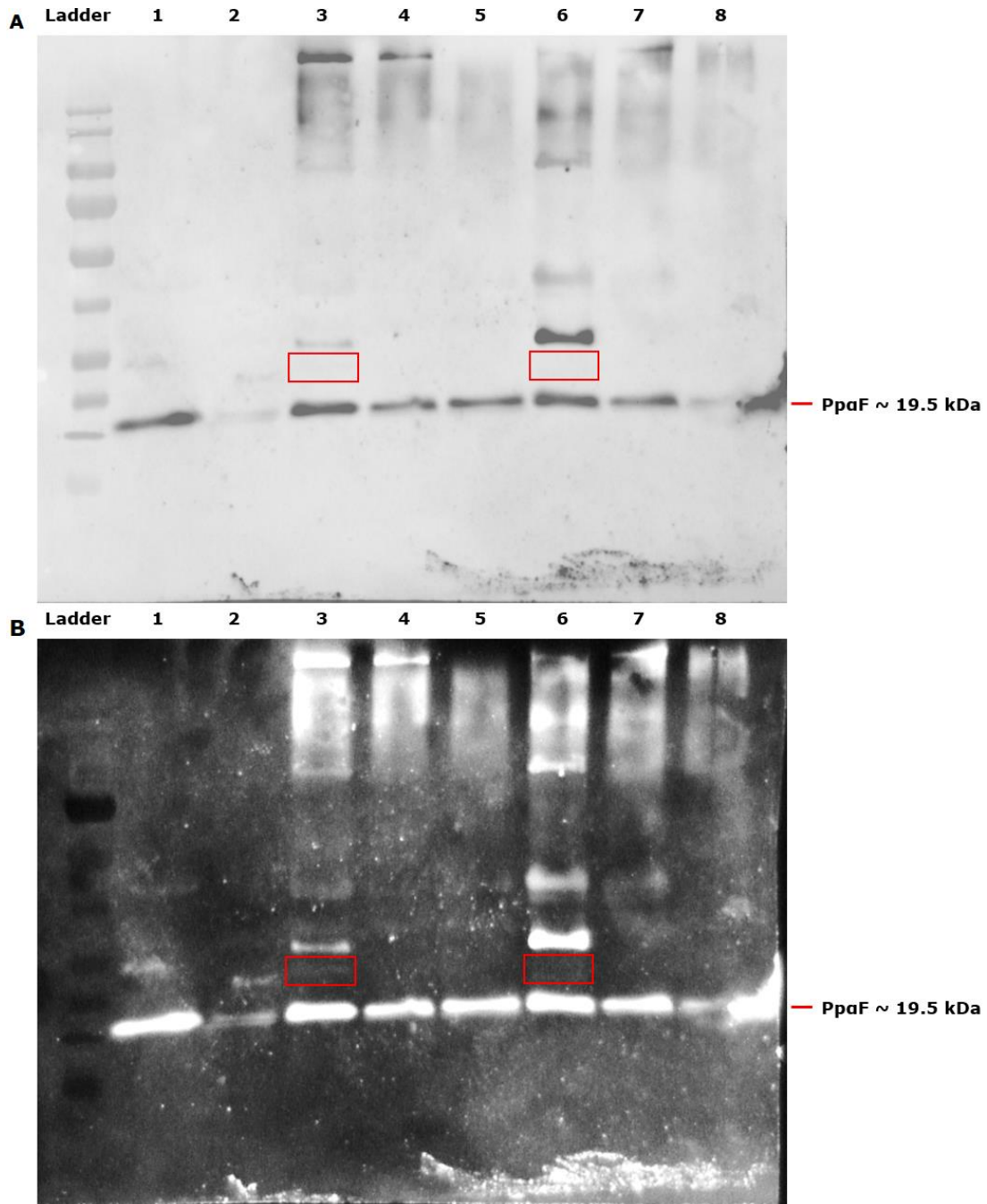
**Figura 16. PAGE nativo al 6% del producto de ligación de PpaF Tyr165Cys-mangas de ADN.** En los carriles **1** y **2** se cargaron 100 y 500 ng de mangas de ADN purificadas respectivamente; se observa una banda única cercana a los 552 pb esperados. En **3** y **4** se cargaron 100 y 500 ng del producto de ligación; se observa la aparición de una segunda banda de mayor masa. En el carril **5** se añadieron 100 ng de producto de ligación previamente incubado con 10 mM de DTT como reductor a 37 °C por 5 min, lo que causó la desaparición de la banda de mayor masa, presuntamente por la ruptura del puente disulfuro. En **6** se añadieron 100 ng de producto de ligación incubados previamente con proteinasa k a 37 °C por 10 min, lo que produjo la desaparición de la banda de mayor masa, presuntamente por la degradación de PpaF. En **7** se cargaron 100 ng de producto de ligación incubados previamente con DNasa I a 37 °C por 10 min, lo que eliminó completamente ambas bandas por degradación del ADN. **Ladder:** estándar de tamaño molecular, en pares de bases de ADN (pb) *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo-Fisher, EE. UU.). Visualización con intercalante SYBR Green I (Invitrogen, EE. UU.).

### **5.3.-Objetivo específico 3: Purificación de translocón Sec61.**

El primer paso para la purificación del translocón Sec61 fue la obtención de microsomas con actividad de translocación. Se llevó a cabo el protocolo de fracción microsomal (ver punto 4.2.8) dos veces, obteniéndose lotes de 8,88 mg/mL y 8,68 mg/mL respectivamente, medido mediante absorbancia a 280 nm. Sin embargo, no se observó una clara actividad de estos en ensayos de translocación mediante protección y glicosilación de PpaF silvestre (ver figura 17). Se ensayó la actividad de microsomas purificados anteriormente en el laboratorio por Hilda Alfaro Valdés (21/10/2016) y almacenados a -80 °C, los cuales sí mostraron claramente glicosilación de PpaF (ver figura 17).

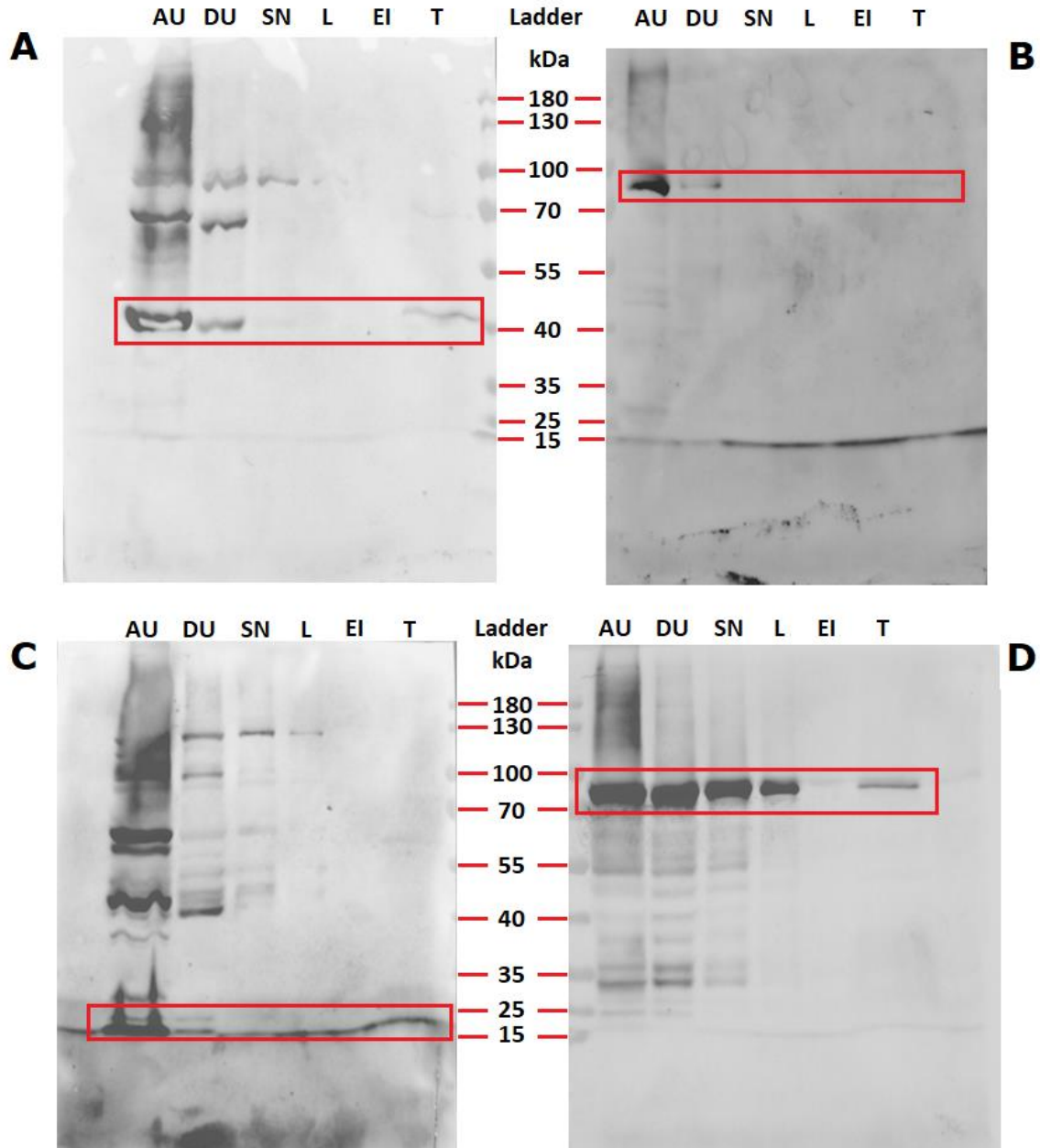
A partir de la fracción microsomal enriquecida con concentración de proteínas igual a 20 mg/mL, se purificaron el translocón Sec61 y el complejo Sec de levadura, para su adhesión a esferas de poliestireno recubiertas de anticuerpos anti-Sec61. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad en lotes (utilizando una resina suelta en vez de columna); esferas de Ni-NTA afines al marcador de histidina 6xHis-*tag* presentes en Sec61 y Sec63 de la cepa *S. cerevisiae* RSY1255. Los productos de purificación quedaron disueltos en detergente digitonina 0,5% p/v. Se corroboró la presencia de Sec61, Sec63, Sec72 y BiP mediante técnica *Western blot* (ver figura 18).





**Figura 17. Western blot del ensayo de translocación de PpaF con microsomas de 20 y 8,68 mg/mL.** Imagen sobreexpuesta sin (**A**) o con (**B**) manipulación de brillo y contraste. En **1**) PpaF. **2**) PpaF + tripsina. **3**) microsomas 20 mg/mL + PpaF. **4**) microsomas 20 mg/mL + PpaF + tripsina. **5**) microsomas 20 mg/mL + PpaF + tripsina + tritón. **6**) microsomas 8,68 mg/mL + PpaF. **7**) microsomas 8,68 mg/mL + PpaF + tripsina. **8**) microsomas 8,68 mg/mL + PpaF + tripsina + tritón. Anticuerpo primario Anti-PpaF 1:1000. Anticuerpo secundario Anti-conejo 1:3000. Revelado con kit West Femto por 1 min. Cuadros rojos: región donde se espera encontrar

banda glicosilada, observable claramente en el carril **3**, correspondiente a microsomas de 20 mg/mL. No se observó de manera clara glicosilación en microsomas de 8,68 mg/mL (carril **6**, cuadro rojo). Imagen sobreexpuesta y con manipulación de brillo y contraste.



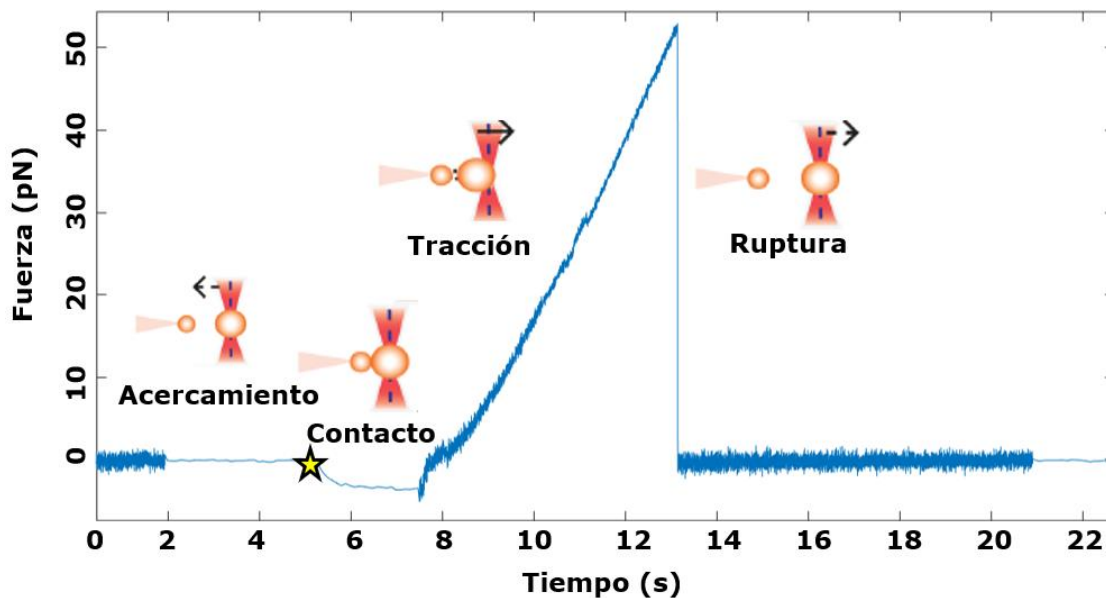
**Figura 18. Western blot de los componentes del translocón.** Se incubaron las membranas con los anticuerpos: **A)** Anti-Sec61 1:5000, **B)** Anti-Sec63 1:10000, **C)** Anti-Sec72 1:500 y **D)** Anti-BiP 1:10000. **AU:** Antes de Ultracentrifugación. **DU:** Después de Ultracentrifugación. **SN:** Sobrenadante de incubación con esferas. **L:** Lavado. **EI:** Elusión Inicial del tubo Amicon 10k. **T:**

Translocón purificado. Anticuerpo secundario Anti-conejo 1:3000. Revelado con kit West Femto, a tiempos: **A)** 44 s, **B)** 16 s, **C)** 10 s, **D)** 10s. En cuadros rojos se enmarcan las bandas más cercanas al peso molecular teórico.

## 5.4.-Objetivo específico 4: Espectroscopía de fuerzas en pinzas ópticas.

### 5.4.1.- Los eventos de ruptura de la espectroscopía de fuerzas entre las mutantes de PpaF y Sec61 muestran un comportamiento elástico

Para corroborar que el experimento se realizó a nivel de molécula individual, se analizaron visualmente los eventos de ruptura (trazas) de la interacción. En condiciones óptimas, las trazas poseen una sola punta que corresponde a la ruptura de la interacción entre dos moléculas. Si la traza posee curvatura en un gráfico de posición (o tiempo, a velocidad constante) versus fuerza, esto indica que se está estirando un componente elástico. El ADN de doble hebra posee un módulo de elasticidad (módulo de Young) = 300 MPa (**Smith et al., 1996**), que sirve como marca característica para indicar que las esferas de poliestireno se encuentran correctamente funcionalizadas. Los experimentos con las mutantes de PpaF presentan trazas curvas, como se ejemplifica en la figura 19.



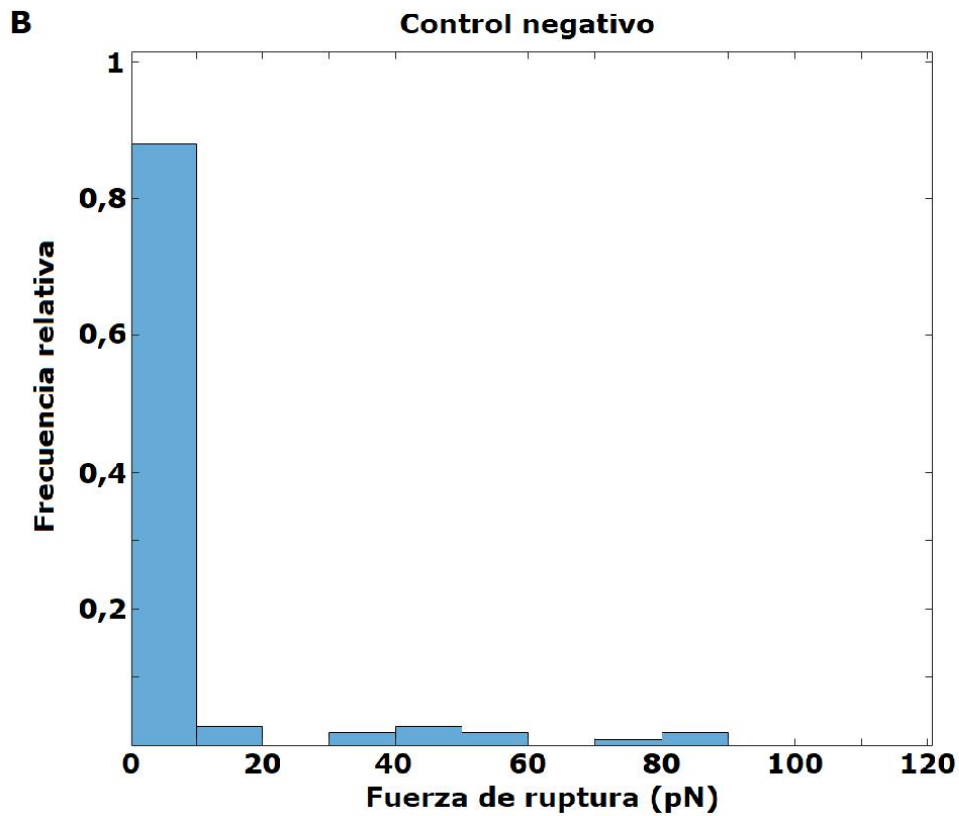
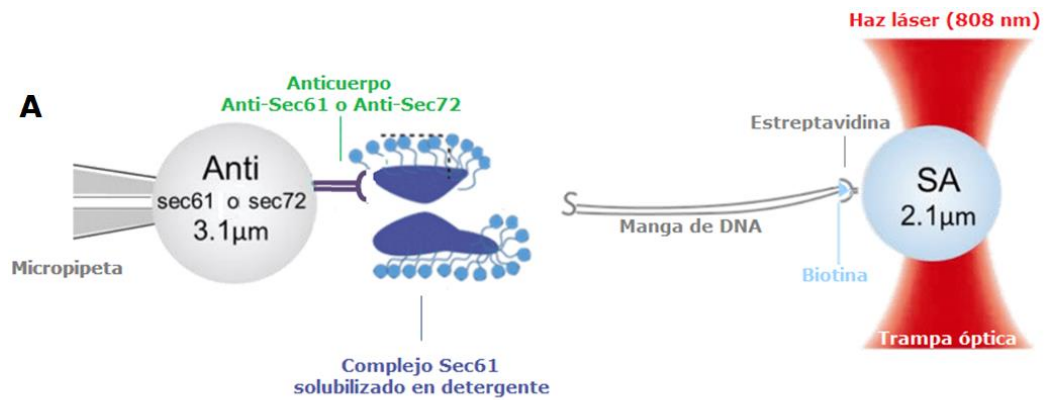
**Figura 19. Traza característica de la espectroscopía de fuerzas entre esferas funcionalizadas.** La traza particular de fuerza contra tiempo ( $v = 100 \text{ nm/s}$ ) corresponde al experimento de interacción entre esferas con Sec61 y PpaF Tyr165Cys (SP silvestre)

respectivamente. Se representan los pasos del experimento correspondiente a cada segmento de la traza. **Estrella amarilla:** contacto. La frecuencia de captura de datos aumenta al iniciar la tracción, lo que se muestra en el gráfico como un aumento del ruido.

#### **5.4.2.- Análisis de datos de pinzas ópticas para obtener interacciones específicas entre PpaF y Sec61**

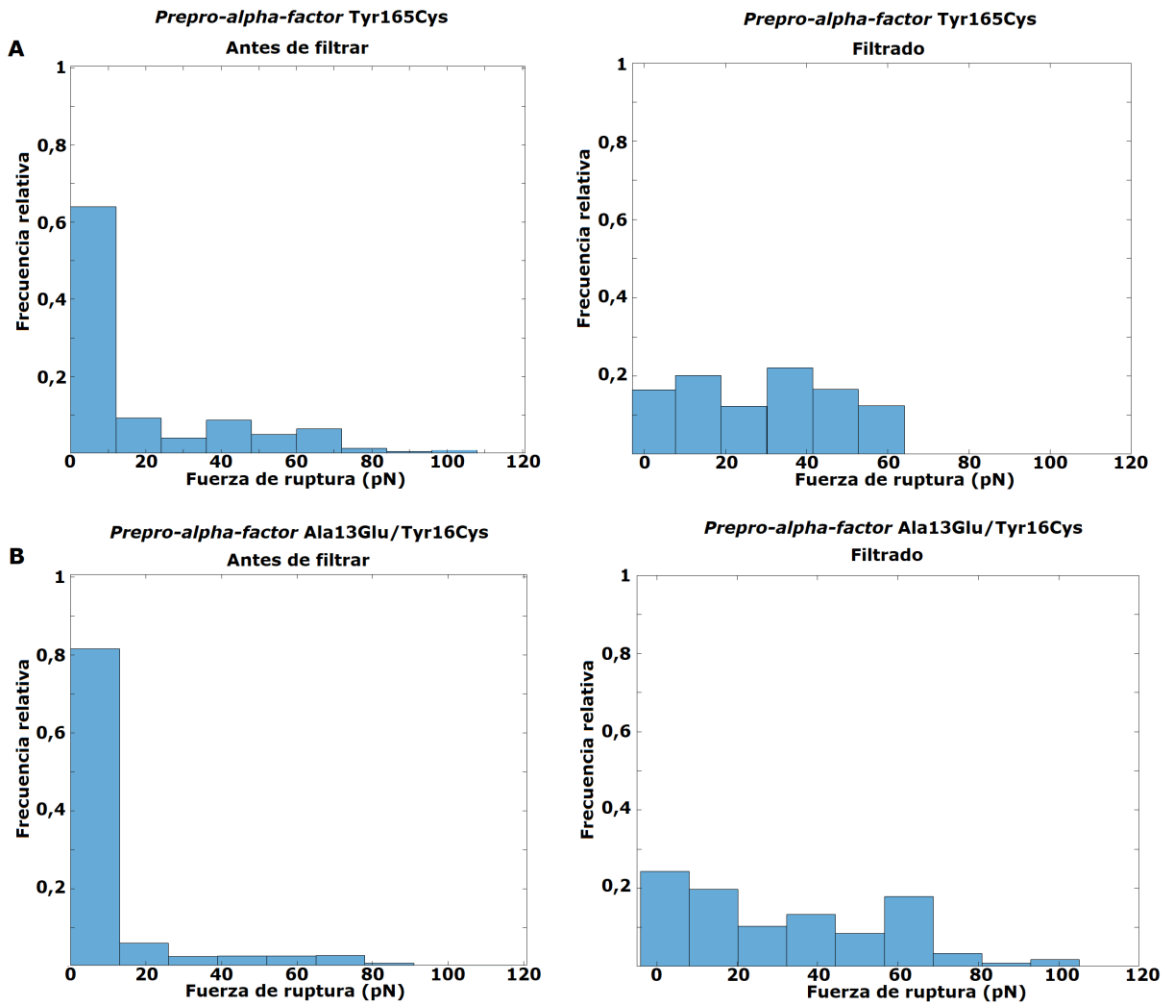
La espectroscopía de fuerzas con pinzas ópticas permite obtener los parámetros cinéticos y termodinámicos de interacción entre PpaF y Sec61 a nivel de molécula individual. El experimento de espectroscopía de fuerzas consta en ciclos de acercamiento y alejamiento, a velocidad constante de 100 nm/s. Los datos obtenidos son fuerzas de ruptura para un n número de eventos. Como control negativo de interacción se utilizó la proteína PpaF silvestre (n = 126 eventos de ruptura, 4 pares de esferas), la cual no se une a la esfera móvil ya que carece de cisteína en su secuencia para formar el puente disulfuro, para medir las fuerzas de interacción inespecíficas del sistema. A partir de los datos de fuerza de ruptura, se construyó un histograma de control negativo (ver figura 20), el cual se utilizó para filtrar los histogramas de las mutantes de PpaF.

Se llevaron a cabo experimentos tanto con la proteína Tyr165Cys, con el péptido señal silvestre, y la doble mutante Ala13Glu/Tyr165Cys, deficiente en translocación (n = 219 eventos de ruptura, 5 pares de esferas y n = 540 eventos de ruptura, 16 pares de esferas respectivamente). Se filtraron los datos de los experimentos con PpaF Tyr165Cys, la cual posee el péptido señal silvestre y se espera que interactúe correctamente con el translocón, y PpaF Ala13Glu/Tyr165Cys, con la mutación de un aminoácido hidrofóbico por uno de carga negativa en su péptido señal que causa una deficiencia en translocación (ver figura 21).



**Figura 20. Histograma de frecuencia relativa de fuerzas de ruptura del control negativo.**

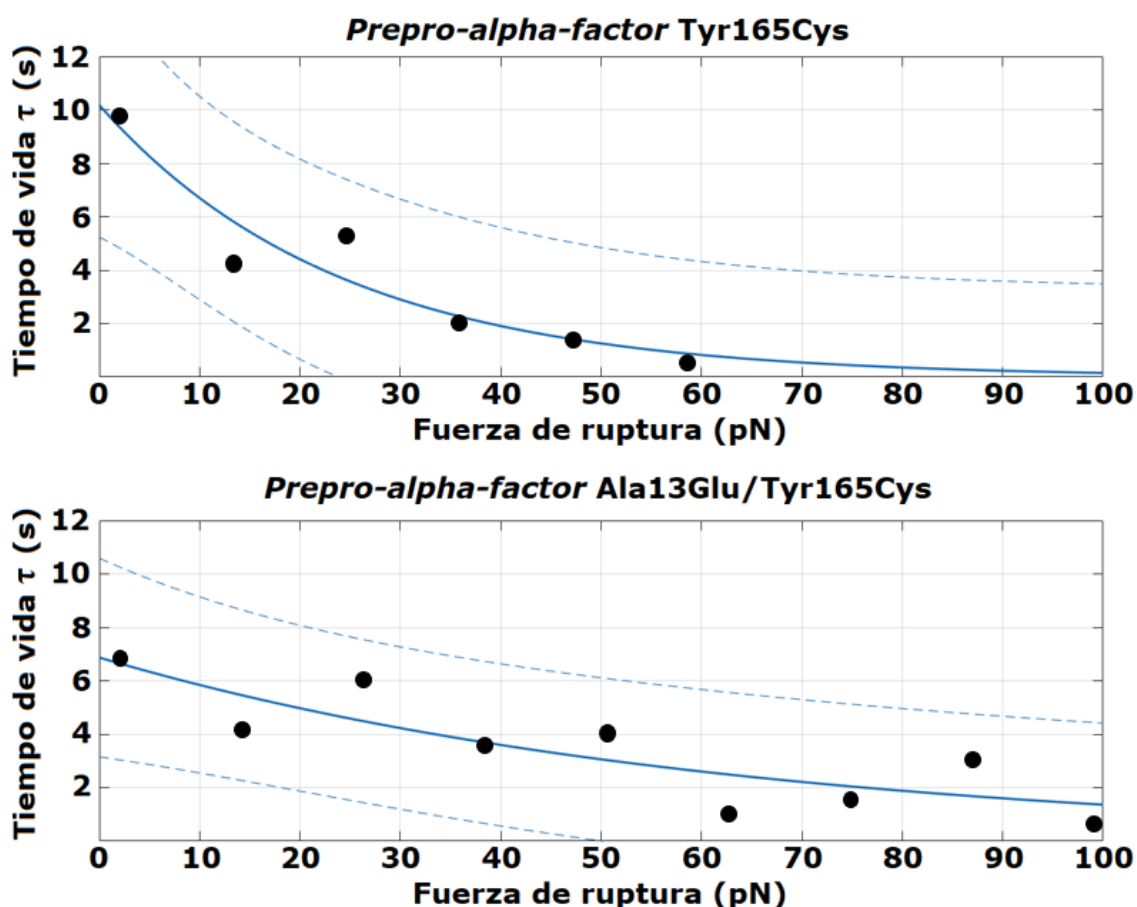
En **A**) se muestra un esquema del control negativo utilizado en el experimento, el cual contiene esferas funcionalizadas con manga de ADN y Sec61 en detergente respectivamente. En **B**) se observa el histograma de frecuencia relativa del control negativo, para un  $n = 126$  eventos de ruptura, 4 pares de esferas. Ancho de barra 10 pN.



**Figura 21. Histogramas normalizados de fuerza de ruptura de la interacción Sec61 con las proteínas PpaF Tyr165Cys y Ala13Glu/Tyr165Cys.** En **A)** y en **B)** se muestran los histogramas obtenidos de los experimentos con PpaF Tyr165Cys ( $n = 225$  eventos de ruptura) y PpaF Ala13Glu/Tyr165Cys ( $n = 540$  eventos de ruptura) respectivamente. Los datos sin procesar del experimento se observan en los gráficos de la izquierda (**Antes de filtrar**) y contienen un gran número de rupturas a baja fuerza, ancho de barra de 10 pN. Luego de filtrar las fuerzas de interacción inespecíficas, se obtienen los gráficos de la derecha (**Filtrado**), que corresponden a las rupturas de interacción específicas entre el translocón y las mutantes de PpaF (6 y 9 barras, de ancho 11,28 y 12,13 pN respectivamente).

### 5.4.3.- Datos cinéticos de disociación obtenidos mediante modelos de Dudko-Hummer-Szabo y Bell

Una vez obtenidos los datos de fuerzas de ruptura específicas, se calcularon los tiempos de vida de la interacción en dependencia de la fuerza,  $\tau(F)$ , a partir de la **ecuación 6**. Se graficaron los datos de tiempo de vida contra fuerza y se ajustaron al modelo de Dudko-Hummer-Szabo (DHS) para distintos valores del factor de escalamiento  $\nu$ . Cuando este factor es igual a 1, el modelo DHS se simplifica a la ecuación de decaimiento exponencial de Bell (ver punto 4.2.15). A partir del ajuste se obtuvieron los datos cinéticos de interacción indicados en la tabla 6.



**Figura 22. Ajuste de Bell en gráficos de fuerza de ruptura contra tiempo de vida de las mutantes de PpaF.** Los puntos corresponden al tiempo de vida calculado para la fuerza media de ruptura de cada barra de los histogramas filtrados. La curva azul es la curva de mejor ajuste a un modelo de decaimiento exponencial, correspondiente a la ecuación de Bell. Las líneas punteadas delimitan el intervalo de confianza de 95% del ajuste.

**Tabla 6. Parámetros obtenidos a partir de los modelos DHS y Bell para las mutantes de PpaF.**

<b>PpaF Ala13</b>	<b>v = 1</b>	<b>v = 1/2</b>	<b>v = 2/3</b>
$\tau_0$ (s)	10 ± 3	10 ± 8	10 ± 19
$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> )	1×10 <sup>-1</sup> ± 2×10 <sup>-2</sup>	1×10 <sup>-1</sup> ± 8×10 <sup>-2</sup>	1×10 <sup>-1</sup> ± 1,8×10 <sup>-1</sup>
$\Delta x^\ddagger$ (nm)	1×10 <sup>-2</sup> ± 4×10 <sup>-3</sup>	1×10 <sup>-2</sup> ± 4×10 <sup>-2</sup>	1×10 <sup>-2</sup> ± 7×10 <sup>-2</sup>
$\Delta G^\ddagger$ (k <sub>B</sub> T)	–	-2×10 <sup>3</sup> ± 10 <sup>7</sup>	-5×10 <sup>2</sup> ± 10 <sup>7</sup>
$R^2_{aj}$	0,8760	0,8347	0,8346
<b>RECM</b>	1,194	1,379	1,380
<b>PpaF Ala13Glu</b>	<b>v = 1</b>	<b>v = 1/2</b>	<b>v = 2/3</b>
$\tau_0$ (s)	7 ± 2	7 ± 3	7 ± 4
$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> )	1,4×10 <sup>-1</sup> ± 4×10 <sup>-2</sup>	1,4×10 <sup>-1</sup> ± 6×10 <sup>-2</sup>	1,5×10 <sup>-1</sup> ± 7×10 <sup>-2</sup>
$\Delta x^\ddagger$ (nm)	4×10 <sup>-3</sup> ± 2×10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup> ± 3×10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup> ± 3×10 <sup>-1</sup>
$\Delta G^\ddagger$ (k <sub>B</sub> T)	–	-5×10 <sup>-2</sup> ± 10 <sup>2</sup>	-7,5×10 <sup>-2</sup> ± 10 <sup>2</sup>
$R^2_{aj}$	0,6872	0,6385	0,6375
<b>RECM</b>	1,201	1,291	1,298

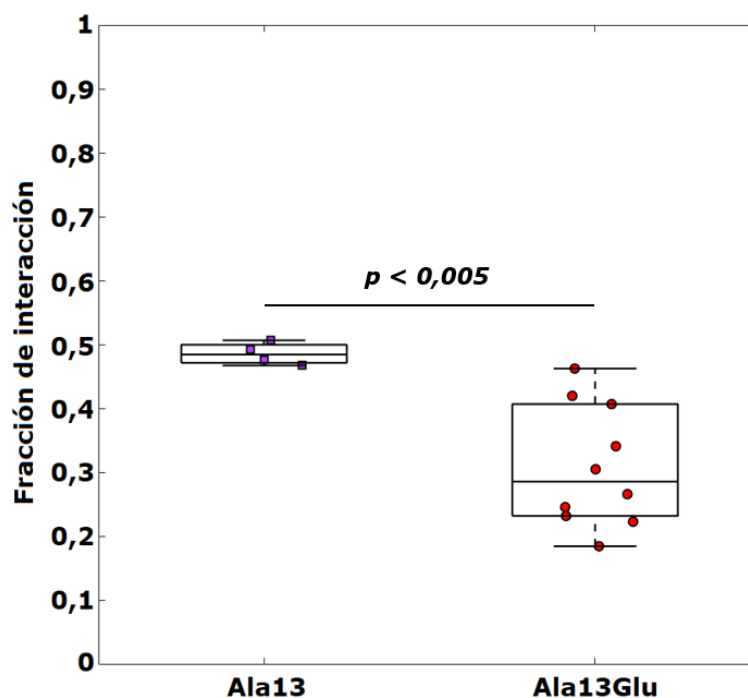
Datos reportados como valor ± 2 \* SE.  $\tau_0$ : tiempo de vida de disociación en s a fuerza cero.  $k_{off}$ : constante cinética de disociación en s<sup>-1</sup> (calculada como el inverso multiplicativo del tiempo de vida).  $\Delta x^\ddagger$ : distancia en nm desde el estado asociado hasta el estado de transición al tirar ambas proteínas desde sus extremos.  $\Delta G^\ddagger$ : diferencia de energía libre en k<sub>B</sub>T (a T = 298 K) desde el estado asociado hasta el estado de transición.  $R^2_{aj}$ : coeficiente de determinación ajustado. **RECM**: raíz del error cuadrático medio. **v**: factor de escalamiento del modelo de DHS. Para **v = 1** se simplifica el modelo y se obtiene la ecuación fenomenológica de Bell, la cual no ajusta un valor de  $\Delta G^\ddagger$ . **PpaF Ala13**: proteína con mutación Tyr165Cys y SP silvestre, n = 6 puntos. **PpaF Ala13Glu**: doble mutante Ala13Glu/Tyr165Cys, n = 9 puntos.

De los modelos DHS, aquel con factor de escalamiento **v = 1** presenta el mejor ajuste a los datos (bajo los criterios de maximizar  $R^2_{aj}$  y minimizar el error **RECM**), en ambas mutantes. A partir de los valores e intervalos de confianza obtenidos por este ajuste, se compararon directamente los parámetros de tiempo de vida mediante una prueba de Student para dos muestras independientes (ver punto 4.2.15, **ecuación 10**). La



comparación entre  $\tau_0$  no presenta diferencia significativa ya que  $p = 0,07$  (no cumple el criterio estándar de significancia  $p < 0,05$ ). En cambio,  $\Delta x \neq$  presenta diferencia, con  $p = 0,03$ . No se analizaron los valores de  $\Delta G \neq$  dados por los ajustes a  $v = 1/2$  y  $v = 2/3$ , ya que el error de la medida asociado a este parámetro es mayor en cuatro órdenes de magnitud ( $10^4$ ) en ambos casos.

Como un indicador de adhesividad de las esferas funcionalizadas, se consideró el número de interacciones efectivas entre ellas. En cada ciclo de acercamiento y alejamiento de las esferas de poliestireno, existe una probabilidad de observar una interacción (un aumento de fuerza contra distancia) o de que las esferas no interaccionen. Esta probabilidad se puede estimar al calcular la fracción de interacción del experimento, vale decir, el número de veces que se observó una interacción dividido en el número total de acercamientos. Al comparar las fracciones de interacción de PpaF Tyr165Cys y PpaF Ala13Glu/Tyr165Cys (ver figura 23), observamos que la mutante deficiente en translocación interacciona un porcentaje significativamente menor de las veces.



**Figura 23. Fracción de interacción de las mutantes de PpaF.** Las esferas funcionalizadas con PpaF Tyr165Cys (**Ala13**) presentan una fracción de interacción de  $0,49 \pm 0,04$  (media  $\pm$  2 desviaciones estándar), mientras que aquellas funcionalizadas con PpaF Ala13Glu/Tyr165Cys (**Ala13Glu**) presentan una fracción de  $0,31 \pm 0,09$  (n=4 y n=10 pares de esferas

respectivamente). Diagrama de cajas y bigotes, la caja representa el rango entre los cuartiles 1 y 3, con la línea interior representando la mediana. Bigotes encasillan el rango total de datos.  $p = 0,004$ .

## **6.-DISCUSIÓN**

A primera vista, era razonable predecir que la mutación Ala13Glu desestabilizaría significativamente la interacción entre el SP y Sec61. En primer lugar, se está mutando un residuo hidrofóbico, posiblemente orientado hacia las colas lipídicas en la compuerta del translocón, por glutamato, un residuo que a pH neutro se suele encontrar cargado negativamente. Por otro lado, alanina es el aminoácido más favorable hacia la formación de estructuras de hélices alfa (**Pace & Scholtz, 1998**), necesaria para orientar los residuos hidrofóbicos del SP hacia la compuerta lateral y los residuos polares hacia el poro acuoso del translocón (**Voorhees & Hegde, 2016b**). En promedio, glutamato es entre 0,16 y 0,4 kcal/mol menos propenso a formar hélices que alanina (**Pace & Scholtz, 1998**), lo que nos puede llevar a pensar que la deficiencia en translocación se debe simplemente a un cambio estructural. No obstante, el modelamiento de ambas proteínas, con SP silvestre y con la mutación Ala13Glu, predicen una estructura helicoidal en los residuos 3-17 (ver figuras 11 y 12). Además, una mutación de el mismo residuo de alanina (Ala13) por prolina (Ala13Pro), residuo que es 3,16 kcal/mol menos propenso a la formación de hélices, solamente causa una reducción de 5 veces en la translocación (**Allison & Young, 1989**). En consecuencia, la deficiencia en translocación de la mutante Ala13Glu no se debe al cambio estructural del SP.

Se observa que la mayor parte de la secuencia después del SP se encuentra desestructurada tanto en PpaF Tyr165Cys como en la doble mutante Ala13Glu/Tyr165Cys (ver figura 12). Dado que existe evidencia de que estructuras posteriores al sitio de corte pueden influenciar sobre el mecanismo de translocación (**Ziska et al., 2019**), fue necesario comparar estos modelos con la estructura de la proteína silvestre. Se modeló PpaF silvestre (dato no mostrado) y se obtuvo el mismo comportamiento desestructurado. Es posible que esta característica le permita a PpaF translocar y ser escindida con mayor facilidad, ya que su forma madura ( $\alpha F$ ) contiene solo 13 residuos de aminoácidos en su secuencia.

Ya se ha validado anteriormente la espectroscopía de fuerzas mediante pinzas ópticas para medir interacción entre proteínas (**Burgos-Bravo et al., 2018; Peña-Oyarzun**

**et al., 2020**). No obstante, la idea de estudiar proteínas de transmembrana solubilizadas en detergente con esa metodología no es trivial. Afortunadamente se ha demostrado que el translocón mantiene su estructura en distintos detergentes (**Itskanov & Park, 2019; Wu et al., 2019**) y que Sec61 no requiere de la formación de oligómeros para ser funcional (**Kalies et al., 2008; Park & Rapoport, 2012**). Teniendo en cuenta que se encuentran presentes todos los componentes esenciales del translocón en la purificación, y que estos se encuentran casi seguramente estructurados en detergente, se deduce que es posible la interacción entre el SP de las quimeras de PpaF y la compuerta lateral en la preparación experimental. Se busca corroborar este hecho próximamente mediante crio microscopía electrónica.

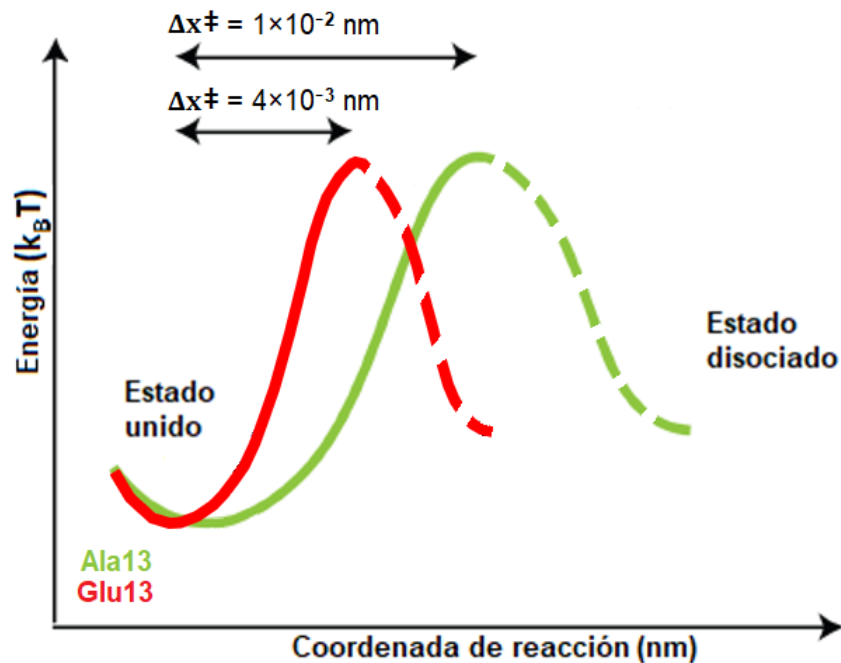
Es factible argumentar, por otro lado, que el anticuerpo Anti-Sec61 utilizado para unir el translocón a las esferas se encuentra obstruyendo el canal, lo que podría afectar el experimento. Este anticuerpo se hizo con los residuos 472-480 del extremo C-terminal de Sec61 como antígeno (cara citosólica, ver tabla 2) pero las estructuras existentes (**Itskanov & Park, 2019; Wu et al., 2019**) llegan hasta el residuo 468. Esto implica que el segmento no resuelto no posee una estructura secundaria definida, por lo que es difícil asignarle una ubicación relativa al poro del translocón. Existe evidencia por inmunoprecipitación de complejos de proteínas (co-IP) que el translocón unido a las esferas mediante este anticuerpo sí se une de manera efectiva a PpaF (**Wilson et al., 2014**).

El translocón Sec61 y el complejo Sec que se utilizaron en este trabajo fueron purificados de la levadura *S. cerevisiae* mediante afinidad a marcadores de histidina 6XHis-tag en Sec61 y Sec63. Sabemos que en esta levadura los porcentajes de translocación cotraduccional y postraduccional son un 40% y 60% respectivamente (**Ast et al., 2013**). Suponiendo que la purificación del translocón y el complejo Sec mantuvo la misma proporción que en la membrana del RE, y que esta proporción concuerda con los porcentajes de translocación, esperaríamos que aproximadamente un 60% de Sec61 en el experimento se encuentra asociado al complejo Sec y, en consecuencia, con su compuerta lateral abierta para la interacción (estado cebado).

La evidencia anteriormente mencionada indica que los componentes del experimento se encuentran purificados y estructurados de forma tal que permite su interacción. Bajo estas condiciones, se aprecia una diferencia significativa en la distancia al estado de

transición,  $\Delta x^\ddagger$ , y no así al tiempo de vida  $\tau_0$  o la constante de disociación  $k_{\text{off}}$  (ver figura 24). Esto contradice de manera directa a la hipótesis original; no existe una diferencia de velocidad de disociación entre la interacción del SP silvestre, y la mutante Ala13Glu, con el translocón.  $\Delta x^\ddagger$  es indicador de la rigidez del sistema: una distancia menor al estado de transición significa que la mutante Ala13Glu requiere separarse menos del translocón, en comparación a la proteína silvestre, para disociarse completamente. Un fenómeno similar se observa en la debilitación por temperatura de ciertas proteínas (**Schlierf & Rief, 2005; Tych et al., 2013**). En estos casos se relaciona una mayor distancia al estado de transición con una dependencia estructural a residuos hidrofóbicos, y una menor distancia con una dependencia a residuos que forman puentes de hidrógeno. Cabe destacar, sin embargo, que la distancia al estado de transición de la mutante Ala13Glu ( $4 \times 10^{-3}$  nm) es menor que la distancia de un puente de hidrógeno ( $\sim 2 \times 10^{-2}$  nm). Dado que en el ajuste de Bell no se obtiene el parámetro de  $\Delta G^\ddagger$ , queda como objetivo próximo demostrar si éste sufre un cambio por la mutación, aunque probablemente no habría cambios ya que las  $k_{\text{off}}$  son del mismo orden.

Por otra parte, se demostró que, a las mismas concentraciones de proteína, las esferas con la mutante Ala13Glu interaccionan en promedio con una frecuencia 20% menor con las esferas recubiertas con Sec61, que aquellas que poseen PpaF con el SP silvestre. Esto podría indicar que el defecto en translocación se debe, al menos en parte, a una menor interacción con el translocón.



**Figura 24. Perfil de energía sugerido por los parámetros cinéticos.** En verde (**Ala13**): PpaF Tyr165Cys, con SP silvestre. En Rojo (**Glu13**): PpaF Ala13Glu/Tyr165Cys. Los parámetros de disociación (línea continua) indican que la mutante Ala13Glu, deficiente en translocación, posee una distancia menor al estado de transición (cima de la curva). A pesar de que no se obtuvieron datos de la energía al estado de transición, una tasa de disociación igual para ambas mutantes sugiere que la altura de las curvas es igual. La línea punteada representa la cinética de asociación, que aún queda por explorar. Imagen modificada de **Burgos-Bravo et al., 2018**.

Una posible explicación de este último resultado es que la mutación Ala13Glu esté cambiando la orientación de inserción del SP en la compuerta lateral. Según un estudio reciente, la presencia de cargas en la secuencia del SP altera la forma en que éste interacciona con el translocón, lo que a su vez afecta su orientación de interacción y el mecanismo preferente de translocación en mamíferos (**Ziska et al., 2019**). La presencia de una carga negativa en la secuencia del SP, como aquella introducida por la mutación Ala13Glu, podría repeler a las cargas negativas de la cara citosólica del translocón, dificultando su interacción, o también verse atraída por las cargas internas del poro, pudiendo orientar al SP en una posición que favorezca la translocación cotraduccional. Esto explicaría por qué la mutación tiene un mayor efecto *in vitro*, en ausencia de ribosomas, que *in vivo*. Aún está por confirmarse si este modelo de translocación es válido para levaduras.

Estudiar la cinética de asociación entre el SP y Sec61 depende de la concentración de ambas especies, parámetro que es muy difícil controlar apropiadamente en la superficie de las esferas de poliestireno a escala femtomolar. Un objetivo a mediano plazo es explorar si la ecuación de Jarzynski (**Jarzynski, 1997**), que permite obtener la energía libre entre el estado asociado y disociado entre ambas proteínas, se puede aplicar apropiadamente en nuestro caso. Esta ecuación requiere un número mayor de datos y un análisis matemático más exhaustivo. De ser posible utilizarla, se podrán explorar de manera indirecta los parámetros cinéticos de asociación, si asumimos que no existen intermediarios en este proceso.

Aunque se ha validado el uso de detergentes, existen alternativas que podrían reducir de manera considerable el ruido por interacciones inespecíficas. Un método novedoso y apropiado son los nanodiscos, que corresponden a discos lipídicos rodeados de proteínas anfipáticas en forma de hélice alfa (**Hagn et al., 2013**). Estos permiten simular un ambiente de membrana reticular cuantizado, en el cual solo se encuentre presente un translocón, por su cuenta o asociado al complejo Sec. De esta forma se pueden llevar a cabo experimentos a nivel de molécula única sin la presencia de detergentes en solución, y en condiciones más similares a las nativas para el translocón (**Sugano et al., 2017**).

Al utilizar como control negativo el sistema con mangas sin PpaF, es posible que haya interacciones inespecíficas que no se están considerando en el filtrado de los datos. Un control con PpaF sin SP debería dar cuenta de la mayoría de las interacciones no contabilizadas actualmente. No obstante, esto no afectaría en gran medida a las diferencias observadas entre las mutantes, sino más bien a la exactitud de los parámetros ajustados.

Otra condición que vale la pena explorar es el uso de distintos anticuerpos para fijar el translocón a las esferas. El anticuerpo anti-Sec61 utilizado se une al extremo C-terminal del translocón, que corresponde a su cara citosólica. Sería interesante comparar los resultados con anticuerpos que se adhieren a la cara luminal. Un anticuerpo contra el complejo Sec (por ejemplo, anti-Sec63 o anti-Sec72 en levaduras) permitiría obtener un porcentaje mayor de translocón con compuerta lateral abierta, ya que el uso de anticuerpos anti-Sec61 no discrimina entre el translocón en estado basal o cebado.

## **7.-CONCLUSIONES**

A partir de la evidencia recopilada en este trabajo, se concluye:

- 1.** La deficiencia en translocación de la mutante Ala13Glu no se debe a cambios estructurales en su péptido señal o después de su sitio de corte.
- 2.** La distancia al estado de transición de la disociación entre PpaF Ala13Glu y el translocón es significativamente menor que aquella de PpaF silvestre. La constante de disociación no presenta cambios entre ambas proteínas. Esto contradice la hipótesis original.
- 3.** El defecto en translocación de la mutante Ala13Glu puede ser multifactorial e incluir defectos de asociación. Las esferas funcionalizadas con PpaF Ala13Glu interaccionan con menor frecuencia con el translocón que aquellas funcionalizadas con proteína silvestre.

## **8.-BIBLIOGRAFIA**

- Allison, D. S., & Young, E. T. (1988). Single-amino-acid substitutions within the signal sequence of yeast prepro-alpha-factor affect membrane translocation. *Molecular and Cellular Biology*, 8(5), 1915–1922. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.5.1915>
- Allison, D. S., & Young, E. T. (1989). Mutations in the signal sequence of prepro-alpha-factor inhibit both translocation into the endoplasmic reticulum and processing by signal peptidase in yeast cells. *Molecular and Cellular Biology*, 9(11), 4977–4985. <https://doi.org/10.1128/MCB.9.11.4977>
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., & Chu, S. (1986). Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optical Angular Momentum*, 11(5), 288–290. <https://doi.org/10.1364/ol.11.000288>
- Ast, T., Cohen, G., & Schuldiner, M. (2013). A network of cytosolic factors targets SRP-independent proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*, 152(5), 1134–1145. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.003>
- Aviram, N., & Schuldiner, M. (2017). Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(24), 4079–4085. <https://doi.org/10.1242/jcs.204396>
- Becker, T., Bhushan, S., Jarasch, A., Armache, J.-P., Funes, S., Jossinet, F., Gumbart, J., Mielke, T., Berninghausen, O., Schulten, K., Westhof, E., Gilmore, R., Mandon, E. C., & Beckmann, R. (2009). Structure of Monomeric Yeast and Mammalian Sec61 Complexes Interacting with the Translating Ribosome. *Science*, 326(5958), 1369–1373.

<https://doi.org/10.1126/science.1178535>

- Bell, G. I. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342), 618–627. <https://doi.org/10.1126/science.347575>
- Blobel, G., & Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *Journal of Cell Biology*, 67(3), 835–851. <https://doi.org/10.1083/jcb.67.3.835>
- Burgos-Bravo, F., Figueroa, N. L., Casanova-Morales, N., Quest, A. F. G., Wilson, C. A. M., & Leyton, L. (2018). Single-molecule measurements of the effect of force on Thy-1/ $\alpha\beta$ 3-integrin interaction using nonpurified proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 29(3), 326–338. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-03-0133>
- Bush, G. L., Tassin, A. M., Fridén, H., & Meyer, D. I. (1991). Secretion in yeast. Purification and in vitro translocation of chemical amounts of prepro-alpha-factor. *Journal of Biological Chemistry*, 266(21), 13811–13814. <https://www.jbc.org/content/266/21/13811.short>
- Bustamante, C., & Smith, S. B. (2006). Light-force sensor and method for measuring axial optical-trap forces from changes in light momentum along an optic axis. US 7,133,132 B2. En *U.S. Patent*. <https://doi.org/09/17/04>
- Bustamante, C., & Smith, S. B. (2007). Optical beam translation device and method utilizing a pivoting optical fiber. US7,274,451 B2. En *U.S. Patent*.
- Cao, T. B., & Saier, M. H. (2003). The general protein secretory pathway: Phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1609(1), 115–125. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00662-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00662-4)
- Caro, L. G., & Palade, G. E. (1964). PROTEIN SYNTHESIS, STORAGE, AND DISCHARGE IN THE PANCREATIC EXOCRINE CELL. *Journal of Cell Biology*, 20(3), 473–495. <https://doi.org/10.1083/jcb.20.3.473>
- Catipovic, M. A., Bauer, B. W., Loparo, J. J., & Rapoport, T. A. (2019). Protein translocation by the SecA ATPase occurs by a power-stroke mechanism. *The EMBO Journal*, 38(9), 1–13. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101140>
- Cecconi, C., Shank, E. A., Dahlquist, F. W., Marqusee, S., & Bustamante, C. (2008). Protein-DNA chimeras for single molecule mechanical folding studies with the optical tweezers. *European Biophysics Journal*, 37(6), 729–738. <https://doi.org/10.1007/s00249-007-0247-y>
- Chattopadhyay, A., & London, E. (1984). Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Analytical Biochemistry*, 139(2), 408–412. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90026-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90026-5)
- Chervenkov, H., & Malcheva, K. (2018). Statistical modelling of extremes with distributions of Fréchet and Gumbel: Parameter estimation and demonstration of meteorological applications. *International Journal Bioautomation*, 22(1), 21–38. <https://doi.org/10.7546/ijba.2018.22.1.21-38>
- Chu, S., & Kron, S. (1990). Optical manipulation of DNA. En A. Owyong, C. Shank, S. Chu, & E. Ippen (Eds.), *International Quantum Electronics Conference*. OSA Publishing.
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J. (2015). JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W389–W394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>



- Dudko, O. K., Hummer, G., & Szabo, A. (2006). Intrinsic rates and activation free energies from single-molecule pulling experiments. *Physical Review Letters*, 96(10), 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.96.108101>
- Dudko, O. K., Hummer, G., & Szabo, A. (2008). Theory, analysis, and interpretation of single-molecule force spectroscopy experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(41), 15755–15760. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806085105>
- Frith, M. C., Forrest, A. R., Nourbakhsh, E., Pang, K. C., Kai, C., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Bailey, T. L., & Grimmond, S. M. (2006). The abundance of short proteins in the mammalian proteome. *PLoS Genetics*, 2(4), 515–528. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020052>
- Godi, M., Mellone, S., Petri, A., Arrigo, T., Bardelli, C., Corrado, L., Bellone, S., Prodam, F., Momigliano-Richiardi, P., Bona, G., & Giordano, M. (2009). A recurrent signal peptide mutation in the growth hormone releasing hormone receptor with defective translocation to the cell surface and isolated growth hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(10), 3939–3947. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0833>
- Gogala, M., Becker, T., Beatrix, B., Armache, J. P., Barrio-Garcia, C., Berninghausen, O., & Beckmann, R. (2014). Structures of the Sec61 complex engaged in nascent peptide translocation or membrane insertion. *Nature*, 506(7486), 107–110. <https://doi.org/10.1038/nature12950>
- Görllich, D., & Rapoport, T. A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 75(4), 615–630. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90483-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90483-7)
- GraphPad. (2016). *Compare two best-fit values from one experiment*. Retrieved July 20, 2020, from <https://www.graphpad.com/support/faq/comparing-fits-to-two-sets-of-data-same-equation/>
- Guo, H., Sun, J., Li, X., Xiong, Y., Wang, H., Shu, H., Zhu, R., Liu, Q., Huang, Y., Madley, R., Wang, Y., Cui, J., Arvan, P., & Liu, M. (2018). Positive charge in the n-region of the signal peptide contributes to efficient post-translational translocation of small secretory preproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 293(6), 1899–1907. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000922>
- Guo, H., Xiong, Y., Witkowski, P., Cui, J., Wang, L. J., Sun, J., Lara-Lemus, R., Haataja, L., Hutchison, K., Shan, S. O., Arvan, P., & Liu, M. (2014). Inefficient translocation of preproinsulin contributes to pancreatic  $\beta$  cell failure and late-onset diabetes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 16290–16302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.562355>
- Hagn, F., Etzkorn, M., Raschle, T., & Wagner, G. (2013). Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 135(5), 1919–1925. <https://doi.org/10.1021/ja310901f>
- Hansen, W., Garcia, P. D., & Walter, P. (1986). In vitro protein translocation across the yeast endoplasmic reticulum: ATP-dependent post-translational translocation of the prepro- $\alpha$ -factor. *Cell*, 45(3), 397–406. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90325-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90325-9)
- Haßdenteufel, S., Nguyen, D., Helms, V., Lang, S., & Zimmermann, R. (2019). ER import of small human presecretory proteins: components and mechanisms. *FEBS Letters*, 593(18), 2506–2524. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13542>
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)

- Itskanov, S., & Park, E. (2019). Structure of the posttranslational Sec protein-translocation channel complex from yeast. *Science*, 363(6422), 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.aav6740>
- Jarzynski, C. (1997). Nonequilibrium equality for free energy differences. *Physical Review Letters*, 78(14), 2690–2693. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.2690>
- Josefsson, L.-G., & Randall, L. L. (1981a). Different exported proteins in *E. coli* show differences in the temporal mode of processing in vivo. *Cell*, 25(1), 151–157. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90239-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90239-7)
- Josefsson, L.-G., & Randall, L. L. (1981b). Processing in vivo of precursor maltose-binding protein in *Escherichia coli* occurs post-translationally as well as co-translationally. *Journal of Biological Chemistry*, 256(5), 2504–2507. <https://www.jbc.org/content/256/5/2504.full.pdf>
- Kalies, K. U., Stokes, V., & Hartmann, E. (2008). A single Sec61-complex functions as a protein-conducting channel. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(12), 2375–2383. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.08.005>
- Lakkaraju, A. K. K., Thankappan, R., Mary, C., Garrison, J. L., Taunton, J., & Strub, K. (2012). Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Molecular Biology of the Cell*, 23(14), 2712–2722. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-03-0228>
- Lyman, S. K., & Schekman, R. (1995). Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 131(5), 1163–1171. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.5.1163>
- Lyman, S. K., & Schekman, R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell*, 88(1), 85–96. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81861-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81861-9)
- Marcinowski, M., Höller, M., Feige, M. J., Baerend, D., Lamb, D. C., & Buchner, J. (2011). Substrate discrimination of the chaperone BiP by autonomous and cochaperone-regulated conformational transitions. *Nature Publishing Group*, 18(2), 150–158. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1970>
- Matlack, K. E. S., Misselwitz, B., Plath, K., & Rapoport, T. A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro- $\alpha$  factor across the ER membrane. *Cell*, 97(5), 553–564. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80767-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80767-9)
- Ng, D. T. W., Brown, J. D., & Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Cell Biology*, 134(2), 269–278. <https://doi.org/10.1083/jcb.134.2.269>
- Novick, P., Ferro, S., & Schekman, R. (1981). Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 25(2), 461–469. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90064-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90064-7)
- Novick, P., & Schekman, R. (1979). Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*, 76(4), 1858–1862. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1858>
- Pace, C. N., & Scholtz, J. M. (1998). A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophysical Journal*, 75(1), 422–427. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(98\)77529-0](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(98)77529-0)
- Palade, G. E., & Siekevitz, P. (1956). LIVER MICROSOMES: AN INTEGRATED MORPHOLOGICAL

AND BIOCHEMICAL STUDY. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 2(2), 171–200. <https://doi.org/10.1083/jcb.2.2.171>

- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., & Rapoport, T. A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, 81(4), 561–570. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90077-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90077-2)
- Park, E., & Rapoport, T. A. (2012). Mechanisms of Sec61/SecY-Mediated Protein Translocation Across Membranes. *Annual Review of Biophysics*, 41(1), 21–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-050511-102312>
- Peña-Oyarzun, D., Rodríguez-Peña, M., Burgos-Bravo, F., Vergara, A., Kretschmar, C., Sotomayor-Flores, C., Ramírez-Sarmiento, C. A., De Smedt, H., Reyes, M., Perez, W., Torres, V. A., Morselli, E., Altamirano, F., Wilson, C. A. M., Hill, J. A., Lavandero, S., & Criollo, A. (2020). PKD2/polycystin-2 induces autophagy by forming a complex with BECN1. *Autophagy*, 1–15. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1782035>
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B. M., Stirling, C. J., & Rapoport, T. A. (1998). Signal Sequence Recognition in Posttranslational Protein Transport across the Yeast ER Membrane. *Cell*, 94(6), 795–807. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81738-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81738-9)
- Quiroga-Roger, D., Alfaro-Valdés, H. M., & Wilson, C. A. M. (2020). Posttranslational Protein Translocation through Membranes at the Single-Molecule Level. En K. Appasani & R. K. Appasani (Eds.), *Single-Molecule Science From Super-Resolution Microscopy to DNA Mapping and Diagnostics* (1<sup>a</sup> ed.). Cambridge University Press. <https://www.cambridge.org/core/books/single-molecule-science/14F0AA8B386FFC35346E7799534DBF99>
- Ramírez, M. P., Rivera, M., Quiroga-Roger, D., Bustamante, A., Vega, M., Baez, M., Puchner, E. M., & Wilson, C. A. M. (2017). Single molecule force spectroscopy reveals the effect of BiP chaperone on protein folding. *Protein Science*, 26(7), 1404–1412. <https://doi.org/10.1002/pro.3137>
- Rapoport, T. A., Li, L., & Park, E. (2017). Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(1), 369–390. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060439>
- Rothblatt, J. A., Webb, J. R., Ammerer, G., & Meyer, D. I. (1987). Secretion in yeast: structural features influencing the post-translational translocation of prepro-alpha-factor in vitro. *The EMBO Journal*, 6(11), 3455–3463. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02669.x>
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Sanders, S. L., Whitfield, K. M., Vogel, J. P., Rose, M. D., & Schekman, R. W. (1992). Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell*, 69(2), 353–365. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90415-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90415-9)
- Schlierf, M., & Rief, M. (2005). Temperature softening of a protein in single-molecule experiments. *Journal of Molecular Biology*, 354(2), 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.070>
- Shank, E. A. (2004). *An investigation of the single molecule behavior of RNase H*. University of California, Berkeley.
- Smith, S. B., Cui, Y., & Bustamante, C. (1996). Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 271, 795–799.

<https://doi.org/10.1126/science.271.5250.795>

- Smith, S. B., Finzi, L., & Bustamante, C. (1992). Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, *258*(5085), 1122–1126. <https://doi.org/10.1126/science.1439819>
- Sugano, Y., Furukawa, A., Nureki, O., Tanaka, Y., & Tsukazaki, T. (2017). SecY-SecA fusion protein retains the ability to mediate protein transport. *PLoS ONE*, *12*(8), e0183434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183434>
- Tych, K. M., Hoffmann, T., Brockwell, D. J., & Dougan, L. (2013). Single molecule force spectroscopy reveals the temperature-dependent robustness and malleability of a hyperthermophilic protein. *Soft Matter*, *9*, 9016–9025. <https://doi.org/10.1039/c3sm51439k>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigyrto, C. A. K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, *347*(6220). <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Van Den Berg, B., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., & Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, *427*(6969), 36–44. <https://doi.org/10.1038/nature02218>
- Van Puyenbroeck, V., & Vermeire, K. (2018). Inhibitors of protein translocation across membranes of the secretory pathway: novel antimicrobial and anticancer agents. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(9), 1541–1558. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2743-2>
- von Heijne, G. (1990). The Signal Peptide. *J. Membrane Biol.*, *115*(3), 195–201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01868635>
- Voorhees, R. M., Fernández, I. S., Scheres, S. H. W., & Hegde, R. S. (2014). Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å resolution. *Cell*, *157*(7), 1632–1643. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.024>
- Voorhees, R. M., & Hegde, R. S. (2016a). Toward a structural understanding of co-translational protein translocation. *Current Opinion in Cell Biology*, *41*, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.04.009>
- Voorhees, R. M., & Hegde, R. S. (2016b). Structure of the Sec61 channel opened by a signal sequence. *Science*, *351*(6268), 88–91. <https://doi.org/10.1126/science.aad4992>
- Walter, P., Gilmore, R., & Blobel, G. (1984). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology*, *38*(1), 5–8. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90520-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90520-8)
- Waters, M. G., Evans, E. A., & Blobel, G. (1988). Prepro-alpha-factor has a cleavable signal sequence. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(13), 6209–6214. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3283123>
- Wilson, C. A. M. (2011). *Single molecule studies by optical tweezers: folding and unfolding of glucokinase from Thermococcus litoralis* [Universidad de Chile]. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/114149>
- Wilson, C. A. M., Vega, M., & Tapia, A. (2014). Functional and structural studies of the BiP chaperon protein and his role in protein translocation: SUN-522. *The Febs Journal*, *281*, 243–244. <https://insights.ovid.com/febs/febsj/2014/09/011/functional-structural-studies-bip->

chaperon-protein/697/01217111

- Wu, X., Cabanos, C., & Rapoport, T. A. (2019). Structure of the post-translational protein translocation machinery of the ER membrane. *Nature*, *566*(7742), 136–139. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0856-x>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, *12*(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yuan, J., Zweers, J. C., van Dijl, J. M., & Dalbey, R. E. (2010). Protein transport across and into cell membranes in bacteria and archaea. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(2), 179–199. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0160-x>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, *9*(40). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- Zheng, W., Li, Y., Zhang, C., Pearce, R., Mortuza, S. M., & Zhang, Y. (2019). Deep-learning contact-map guided protein structure prediction in CASP13. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *87*(12), 1149–1164. <https://doi.org/10.1002/prot.25792>
- Zimmermann, R., Eyrich, S., Ahmad, M., & Helms, V. (2011). Protein translocation across the ER membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1808*(3), 912–924. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.015>
- Ziska, A., Tatzelt, J., Dudek, J., Paton, A. W., Paton, J. C., Zimmermann, R., & Haßdenteufel, S. (2019). The signal peptide plus a cluster of positive charges in prion protein dictate chaperone-mediated Sec61 channel gating. *Biology Open*, *8*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1242/bio.040691>