



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Cinvestav

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**EL EFECTO ESTÉRICO DEL  
ABARROTAMIENTO INTRACELULAR  
DINÁMICO SOBRE LA TRANSLOCACIÓN  
DE CADENAS PEPTÍDICAS**

Tesis que presenta  
**JOSÉ ANTONIO VÉLEZ PÉREZ**  
para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias (Física)**

Asesores: Dr. Orlando Guzmán López  
Dr. Fernando Navarro García

Jurado calificador:  
Presidente: Dr. Michel Picquart  
Secretario: Dr. Orlando Guzmán López  
Vocal: Dr. Luis Agustín Olivares Quiroz  
Vocal: Dr. Gerardo Pérez Hernández

México, D.F., Julio 2014

## Resumen

El proceso de transporte de una preproteína a través de una membrana por un poro se llama translocación, un proceso común en todas las células. A través de la membrana del retículo endoplásmico (RE) ocurre la translocación de preproteínas del citoplasma al lumen del retículo endoplásmico, y también la retrotranslocación, que es la translocación del lumen del RE al citoplasma.

El citoplasma y el lumen del RE son medios que contienen proteínas de diferentes especies, con una concentración total mayor en un orden de magnitud a la concentración de los solutos en un ambiente diluido (menor a 10 mg/ml). Los valores de concentración y de la fracción de volumen que ocupan las proteínas definen al citoplasma y al lumen del RE como medios abarrotados por proteínas.

Durante la translocación y la retrotranslocación, una preproteína tiene segmentos en el citoplasma y en el lumen del RE. Las proteínas que abarrotan ambos medios interactúan con la preproteína y le excluyen volumen. Entre mayor sea el volumen excluido, menor es el número de conformaciones que adopta la preproteína, y en consecuencia, su energía libre cambia. El impedimento en conformaciones por la exclusión de volumen es llamado impedimento estérico; al modificar la energía, se considera como una interacción estérica.

El cambio en la energía libre por la contribución estérica del abarrotamiento sugiere que la translocación de una preproteína por el abarrotamiento intracelular por proteínas debe ser diferente de la translocación en un ambiente sin abarrotar. Los experimentos sobre translocación no han incluido el abarrotamiento por proteínas.

En este trabajo, estudiamos el efecto estérico del abarrotamiento por proteínas sobre la translocación y la retrotranslocación de una preproteína a través de la membrana del retículo endoplásmico. Para ello, utilizamos tres modelos de translocación de polímeros, uno sin abarrotar y dos abarrotados, tomando en cuenta las fracciones de volumen de las proteínas abarrotantes y las propiedades físicas del medio intracelular.

En los modelos utilizados de la translocación de polímeros, una cadena ideal atraviesa una pared rígida delgada a través de un poro, similar a la translocación de una preproteína. En el modelo sin abarrotar, llamado sistema diluido, una cadena atraviesa en ausencia de agentes que obstaculicen su paso. En los modelos abarrotados, una cadena atraviesa en presencia de agentes esféricos distribuidos aleatoriamente, con fracciones de volumen diferentes en ambos lados de la pared. Si los agentes abarrotantes carecen de movimiento, el sistema se llama abarrotado en un régimen estático, y si presentan movilidad el sistema se llama abarrotado en un régimen dinámico.

Para cumplir con nuestro objetivo de estudio, calculamos las siguientes variables físicas para la translocación y la retrotranslocación en un sistema diluido y en los sistemas abarrotados: la energía libre, la energía de activación, la fuerza entrópica y el tiempo de transporte. Después, comparamos los resultados de los tres modelos de translocación utilizando las fracciones de volumen de las proteínas que abarrotan y la longitud de una preproteína en translocación.

Aunque se conoce que las proteínas abarrotantes se encuentran en movimien-

to, mostramos que la translocación ocurre en un ambiente abarrotado dinámico. Esto se debe a la movilidad de las proteínas abarrotantes y a las propiedades físicas del medio intracelular. Basados en este primer resultado, comparamos los resultados de la translocación del sistema abarrotado dinámico con los del sistema diluido. Por abarrotamiento dinámico, todas las variables físicas calculadas aumentan su valor.

La energía libre presenta una barrera; la altura de la barrera definida como la energía de activación aumenta dos veces su valor para preproteínas pequeñas y hasta en cuatro veces para preproteínas grandes. La fuerza de origen entrópico, para los sistemas diluido y abarrotado, al principio es opuesta a la translocación, se reduce hasta anularse, y después aumenta, favoreciendo la translocación. Por el abarrotamiento, la tasa de variación de la fuerza disminuye al inicio y al final de la translocación; en consecuencia, una mayor intensidad de la fuerza persiste por más tiempo durante la translocación. El tiempo de translocación resulta más afectado por el abarrotamiento. Para las preproteínas más pequeñas, el tiempo de translocación aumenta de entre cinco a 10 veces, mientras que para las proteínas más grandes aumenta en cuatro órdenes de magnitud. El origen del efecto tan drástico sobre el tiempo de translocación, se debe a una sinergia entre el efecto del abarrotamiento sobre la energía libre y sobre el coeficiente de difusión de una preproteína. Esta última cantidad es más importante para preproteínas grandes, debido a que se reduce su movilidad. Los resultados de las comparaciones indican que el efecto del abarrotamiento dinámico es importante porque incrementa las variables de la translocación.

Los resultados de la translocación, por abarrotamiento dinámico, son similares a los de la retrotranslocación para todas las variables, excepto para el tiempo de transporte para preproteínas grandes, debido al coeficiente de difusión de una proteína en el lumen del RE.

Aunque el abarrotamiento intracelular por proteínas corresponde a un régimen dinámico, también estudiamos la translocación en un ambiente abarrotado estático para cuantificar el efecto del abarrotamiento por agentes sin movimiento. Los resultados de la translocación en el sistema abarrotado estático son similares numéricamente a los del sistema diluido. En consecuencia, al comparar entre abarrotamiento estático y abarrotamiento dinámico, las diferencias aumentan con la longitud de una preproteína.

La energía de activación por abarrotamiento dinámico es 1.2 veces la del sistema abarrotado estático para cadenas pequeñas, y aumenta a 3.4 veces para preproteínas grandes. El tiempo de translocación corresponde a 1.7 veces el del sistema estático para cadenas cortas y aumenta a más de 1000 veces para cadenas largas. Estas comparaciones indican que el efecto del abarrotamiento dinámico es más importante que el efecto del abarrotamiento estático. Por lo tanto, además del abarrotamiento intracelular, debe considerarse la movilidad de las proteínas abarrotantes en el estudio de la translocación.

Nuestros resultados tienen implicaciones sobre el estudio de la translocación. Para vencer la barrera de energía que impone el abarrotamiento dinámico, el sistema de translocación debe invertir una cantidad de energía comparable a la energía libre de la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP), 60 kJ/mol. El

ATP es la principal molécula que provee energía en las células. Las velocidades de translocación para cadenas grandes, por abarrotamiento dinámico, tienen el mismo orden de magnitud de las medidas en ambientes diluidos; esto indica que el efecto del abarrotamiento puede medirse experimentalmente. Para ello, el abarrotamiento debe ser dinámico, y los valores de la viscosidad y del coeficiente de difusión de los agentes abarrotantes deben ser similares a los del medio intracelular. De nuestros resultados, la translocación de la mayoría de las preproteínas, debido a su tamaño, es más rápida que la translocación en sistemas *in vitro*. Esto implica que existen fenómenos no estéricos que ralenticen la translocación, como el proceso de abertura del canal para permitir que una preproteína se difunda libremente, como lo sugiere uno de los modelos actuales de la translocación en bacterias.

## Agradecimientos

El trabajo de investigación doctoral fue posible gracias a los apoyos académico, financiero y moral de diferentes actores.

Agradezco a mis asesores, el Dr. Orlando Guzmán López y el Dr. Fernando Navarro-García, por guiar y trabajar como colegas en esta tesis de doctorado. Agradezco al Dr. Rolland Faller por aceptar mi estancia en la Universidad de California, Campus Davis, donde trabajé en simulaciones de plegamiento de polipéptidos.

Agradezco al CONACYT por otorgar una beca para realizar mis estudios de doctorado, bajo el número de becario 203112. Agradezco el apoyo económico recibido del proyecto de UC-MEXUS-CONACYT con número CN-10-396, a cargo de los doctores Orlando Guzmán y Rolland Faller, por hacer posible mi estancia en UC Davis. Agradezco a la Red Temática de la Materia Condensada Blanda (CONACYT) por el financiamiento otorgado para asistir a la APS March Meeting, donde expuse el tema *Preprotein translocation across the endoplasmic reticulum membrane in milieus crowded by proteins*, el día 27 de Febrero de 2012. Agradezco a la Universidad Iberoamerica, campus Ciudad de México, por contratarme como Profesor de Asignatura, con lo cual pude financiar la última parte de mi tesis.

Por último, agradezco el apoyo de mi familia nacional e internacional, por estar presentes en los momentos fáciles y difíciles, por brindar confianza y confort, y por sus sabios consejos.

Chema, tu nobleza y aprecio me inspirarán para terminar esta tesis, gracias.

# Índice general

Resumen . . . . .	I
Agradecimientos . . . . .	IV
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico	2
1.2. Retrotranslocación a través de la membrana del retículo endoplásmico . . . . .	5
1.3. El canal de transporte . . . . .	7
1.3.1. Estructura del canal conductor de proteínas . . . . .	7
1.4. Abarrotamiento intracelular y el efecto sobre las proteínas . . . . .	9
1.5. Modelos de translocación para polímeros . . . . .	13
<b>2. Planteamiento del problema y objetivos de estudio</b>	<b>15</b>
2.1. Objetivos . . . . .	17
2.1.1. Objetivo general . . . . .	17
2.1.2. Objetivos particulares . . . . .	17
<b>3. Metodología: Modelos para el transporte de cadenas en membranas a través de poros</b>	<b>19</b>
3.1. La cadena ideal en el espacio libre . . . . .	19
3.1.1. Cantidades promedio . . . . .	20
3.2. Modelo para el transporte de una cadena ideal a través de un poro sobre una pared: el modelo diluido . . . . .	21
3.2.1. Energía libre de una cadena ideal en translocación . . . . .	22
3.3. Modelo de transporte para una cadena en un ambiente abarrotado por agentes esféricos sin movimiento: el modelo abarrotado estático . . . . .	26
3.3.1. Energía libre para una cadena en un ambiente abarrotado estático . . . . .	27
3.3.2. Energía libre de un segmento rodeado por agentes esféricos estáticos . . . . .	29
3.4. Modelo de transporte para una cadena en un ambiente abarrotado por agentes esféricos móviles: el modelo abarrotado dinámico . . . . .	33
3.4.1. Energía libre para una cadena en un régimen dinámico . . . . .	34

3.4.2. Energía libre de un segmento de cadena en un régimen dinámico . . . . .	34
<b>4. Metodología: Tiempo promedio de primer paso</b>	<b>39</b>
4.1. Función de distribución . . . . .	39
4.2. Tiempo promedio de primer paso . . . . .	40
4.3. La ecuación diferencial para el tiempo promedio de primer paso . . . . .	43
4.4. Solución de la ecuación diferencial para el tiempo promedio de primer paso . . . . .	44
<b>5. Resultados: Validación de abarrotamiento dinámico para el medio intracelular</b>	<b>46</b>
5.1. El medio intracelular se encuentra abarrotado por proteínas . . . . .	46
5.2. Modelos para el coeficiente de difusión de las proteínas en el citoplasma y en el lumen del retículo endoplásmico . . . . .	48
5.2.1. Ajustes como función del tamaño $N$ al coeficiente de difusión de proteínas . . . . .	48
5.2.2. Ajustes al coeficiente de difusión para proteínas como función del grado de abarrotamiento $\phi$ . . . . .	55
5.2.3. El coeficiente de difusión para proteínas como función del tamaño $N$ y de la fracción de volumen $\phi$ . . . . .	58
5.3. Modelo para el coeficiente de difusión de una preproteína en translocación . . . . .	59
5.4. Longitud de las cadenas translocadas hacia el lumen del retículo endoplásmico . . . . .	60
5.5. Distancia entre dos aminoácidos . . . . .	61
5.6. Viscosidad del medio intracelular . . . . .	63
5.7. El medio intracelular es un medio abarrotado en un régimen dinámico . . . . .	64
5.7.1. Los tiempos característicos de la translocación . . . . .	64
5.7.2. Definición de los regímenes dinámico y estático . . . . .	65
5.7.3. Abarrotamiento dinámico en el citoplasma . . . . .	66
5.7.4. Abarrotamiento dinámico en el lumen del RE . . . . .	68
5.8. Recapitulación . . . . .	69
<b>6. Resultados: Variables físicas de la translocación y de la retro-translocación</b>	<b>70</b>
6.1. El sistema diluido y el régimen dinámico . . . . .	70
6.1.1. La energía libre y la energía de activación en un ambiente diluido . . . . .	70
6.1.2. La energía libre y la energía de activación en un ambiente abarrotado dinámico . . . . .	71
6.1.3. La fuerza por abarrotamiento dinámico . . . . .	76
6.1.4. Tiempo de translocación en un ambiente abarrotado dinámico . . . . .	82

6.1.5.	Tiempo de translocación en un ambiente de agentes abarrotados de tamaño fijo . . . . .	88
6.2.	El régimen estático . . . . .	92
6.2.1.	La energía libre y la energía de activación en el régimen estático . . . . .	92
6.2.2.	La fuerza en el régimen estático . . . . .	95
6.2.3.	Tiempo de translocación en el régimen estático . . . . .	96
6.2.4.	Tiempo de translocación y retrotranslocación como función de $\phi_{cit}$ y $\phi_{RE}$ . . . . .	96
6.3.	Sinergia entre el coeficiente de difusión y la energía libre en el tiempo de transporte . . . . .	99
6.3.1.	Sinergia en la translocación para el caso dinámico . . . . .	101
6.3.2.	Sinergia en la translocación para el caso estático . . . . .	102
6.3.3.	El tiempo de translocación cuando el coeficiente de difusión es constante . . . . .	104
<b>7.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>106</b>
7.1.	Translocación en el sistema diluido . . . . .	107
7.2.	Translocación en un sistema abarrotado . . . . .	108
7.2.1.	Translocación en un sistema abarrotado dinámico . . . . .	108
7.2.2.	Translocación en un sistema abarrotado estático . . . . .	110
7.3.	Conclusión general . . . . .	111
<b>8.</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>112</b>
8.1.	El efecto de la tendencia de un aminoácido a participar en una estructura helicoidal . . . . .	112
8.2.	El efecto de la abertura sobre el tiempo de translocación . . . . .	113
8.3.	El efecto del grosor de la membrana sobre la translocación de cadenas cortas . . . . .	114
	<b>Bibliografía</b>	<b>115</b>

# Capítulo 1

## Introducción

En el interior de las células, ocurre el transporte de proteínas y preproteínas a través de canales proteicos embebidos en membranas. Para la translocación y retrotranslocación de preproteínas a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE), una cadena peptídica es transportada entre el citoplasma y el lumen del retículo endoplásmico. En este proceso, segmentos de la cadena a uno y otro lado de la membrana se encuentran rodeados por diferentes especies de macromoléculas, principalmente proteínas. En el citoplasma y el lumen del RE, la concentración de todas las especies de proteínas, y por lo tanto, la fracción de volumen que ocupan, los definen como medios abarrotados por proteínas.

El abarrotamiento, debido a la reducción del volumen disponible por el volumen ocupado por las proteínas que abarrotan, modifica las propiedades de proteínas de prueba. Proteínas de prueba en sistemas abarrotados por proteínas experimentan diferentes fenómenos, por ejemplo, una disminución en el coeficiente de difusión, un aumento en las actividades de reacción, cambios en la velocidad de renaturalización o incluso inhibición del plegamiento, entre otros. Estudiar el efecto del abarrotamiento por proteínas sobre el proceso de translocación o de retrotranslocación de una preproteína es un proceso complejo, debido a las escalas del sistema, y a un difícil control de las etapas de la translocación mediadas por reacciones químicas y sus velocidades de reacción. Por ello, en esta tesis, se estudia el efecto estérico del abarrotamiento por proteínas sobre la translocación y la retrotranslocación de preproteínas.

En este capítulo, primero describimos los elementos que forman al sistema de translocación, el proceso de translocación y de retrotranslocación, y sus características principales. Después, indicamos que el medio intracelular se encuentra abarrotado por proteínas, y describimos los efectos del abarrotamiento sobre una proteína. Por último, indicamos los modelos de translocación que nos permiten cuantificar el efecto estérico del abarrotamiento sobre la translocación.

## 1.1. Translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico

Una cadena peptídica es una cadena formada por aminoácidos. Cuando la cadena peptídica no ha experimentado el proceso de plegamiento se conoce como cadena precursora o preproteína. En el interior de las células, ocurre el transporte de preproteínas a través de una membrana, llamado translocación [53]. En las células eucariotas<sup>1</sup>, la translocación ocurre entre el citoplasma y el interior de un organelo, como el de las mitocondrias, de los cloroplastos o el lumen del retículo endoplásmico (RE) [1, 107]. En este trabajo nos enfocamos en la translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico.

La translocación hacia el interior o lumen del retículo endoplásmico, referido de ahora en adelante como lumen del RE, ocurre para preproteínas destinadas a convertirse en proteínas solubles o en proteínas de membrana [21, 53, 70]. En el lumen del RE existen las condiciones necesarias para que una preproteína experimente el proceso de plegamiento y se convierta en una proteína funcional. El plegamiento correcto de las proteínas es vital para el funcionamiento correcto de las células<sup>2</sup>. Las proteínas solubles se clasifican en proteínas residentes y en proteínas de secreción. Las proteínas residentes permanecen en el lumen del RE para desempeñar funciones específicas, como asistir el plegamiento o almacenar calcio [12], o son transportadas hacia el interior del aparato de Golgi o de los lisosomas [21, 53]. Las proteínas de secreción son liberadas al medio extracelular para desarrollar su función [117, 99]. Las proteínas de membrana pueden integrarse a la membrana del RE durante la translocación o son transportadas mediante vesículas hacia la membrana de otros organelos y a la membrana plásmática [21]. La translocación ocurre para un gran número de preproteínas, tomando en cuenta que aproximadamente el 30 % del total de proteínas corresponde a proteínas de secreción [65, 94].

La translocación de preproteínas hacia el lumen del RE puede ocurrir de dos formas. Si la translocación ocurre durante la traducción de la cadena peptídica en el ribosoma, se llama translocación cotraduccional, y si ocurre después de la traducción, se llama translocación postraduccional [70].

La translocación cotraduccional ocurre de la siguiente forma. El complejo formado por el ribosoma y la cadena en síntesis es dirigido a la membrana del RE por la partícula de reconocimiento de señal (SRP) [53, 74]. En la membrana, se encuentra embebido un canal proteico por donde se conduce la preproteína en síntesis, para atravesar o para integrarse a la membrana [81]. La SRP adherida al ribosoma y a la secuencia de señal<sup>3</sup> de la cadena naciente<sup>4</sup>, un segmento de entre 16 a 30 aminoácidos con un núcleo hidrófobo de seis a doce aminoácidos, detiene

<sup>1</sup>Una célula eucariota se caracteriza por tener la región nuclear bien definida, y en su interior presenta organelos, a diferencia de una célula procariota, que no tiene bien definido el núcleo y carece de organelos.

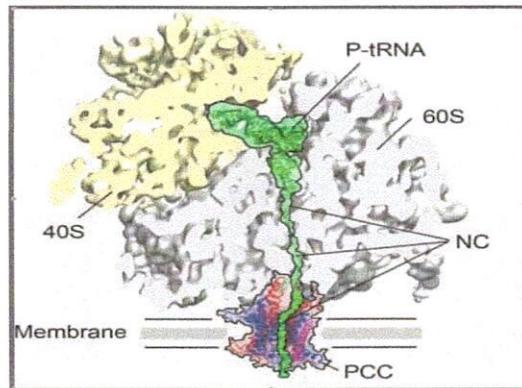
<sup>2</sup>No todas las proteínas deben plegarse para ser funcionales.

<sup>3</sup>La secuencia de señal es un conjunto de aminoácidos en el N terminal con los cuales se identifican las preproteínas que deben ser translocadas.

<sup>4</sup>Se designa cadena naciente a una cadena en síntesis.

temporalmente la síntesis. Cuando el complejo ribosoma-cadena naciente-SRP llega a la membrana, el complejo se acopla al canal de translocación, mediado, primero por la interacción entre la SRP y su receptor, una proteína integral de membrana [53], y después, por la interacción entre el ribosoma y el canal [74]. La hidrólisis de guanosín trifosfato (GTP) en el receptor de la SRP desacopla la SRP del ribosoma, y al mismo tiempo libera la cadena naciente [53]. Este hecho permite que se reinicie la traducción en el ribosoma, y debido a la proximidad entre el ribosoma y el canal, la cadena naciente atraviesa el canal proteico [7, 74]. La translocación cotraducciona es dirigida por el ribosoma, con una tasa de translocación dada por la razón de síntesis, en sistemas *in vivo*, es de 15–20 aminoácidos (aa) por segundo para procariontes y de 3–4 aa/s para eucariontes [18].

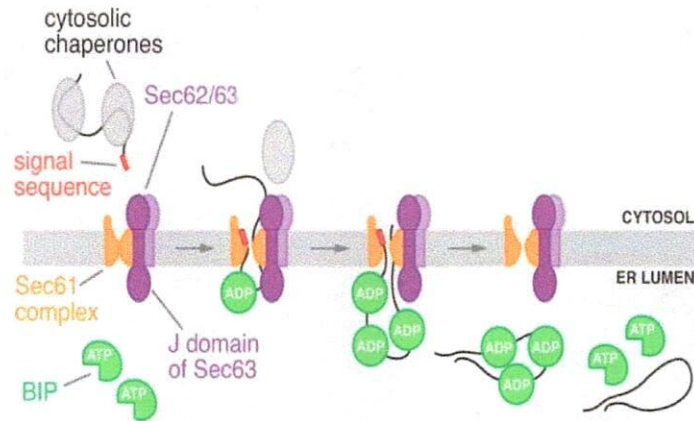
En la Figura 1.1, se muestra el sistema durante la translocación cotraducciona. En la Figura 1.1, la cadena naciente (NC) en color verde sale del ribosoma y atraviesa el canal conductor de proteínas (PCC) embebido en la membrana. Las subunidades principales que conforman al ribosoma, 40S y 60S, también se indican.



**Figura 1.1:** Sistema ribosoma-cadena naciente-canal proteico conductor de proteínas durante la translocación cotraducciona. Imagen tomada de la referencia [7].

En la translocación postraducciona en eucariontes, una cadena sintetizada debe mantenerse desplegada o ligeramente plegada para poder atravesar el canal conductor sobre la membrana [81]. En el citoplasma, las chaperonas de la familia Hsp70 se adhieren a la preproteína para evitar su plegamiento [21]. La interacción de la preproteína con un complejo formado por proteínas de membrana, llamado complejo Sec62/Sec63, permite la liberación de las chaperonas para iniciar la translocación [74]. Durante la translocación, la cadena puede moverse en ambas direcciones por movimiento browniano [74]. Cuando un segmento de

la cadena ha atravesado el canal, las chaperonas BiP que se encuentran en el lumen del RE se adhieren al segmento entrante evitando deslizamiento de regreso hacia el citoplasma. Este fenómeno de trinquete genera un movimiento neto hacia el lumen del RE resultando en la translocación de la cadena [81, 74]. El fenómeno de trinquete se consigue cuando una molécula de BiP con ATP en una conformación de bolsillo abierto con afinidad para péptidos, interactúa con el dominio luminal J del complejo Sec63 que se encuentra cerca del canal por donde entra la preproteína al lumen. La interacción causa la hidrólisis de ATP (generando ADP) y un cambio conformacional en forma de bolsillo cerrado de la BiP, por su proximidad con el canal se facilita la interacción y adhesión con el segmento entrante de la preproteína. Cuando la preproteína se ha movido una distancia considerable, otra molécula de BiP puede adherirse, repitiendo el fenómeno de trinquete hasta conseguir la translocación completa de la cadena [74]. En la Figura 1.2, se ilustran los pasos de la translocación postraduccional.



**Figura 1.2:** Pasos de la translocación postraduccional. Imagen tomada de la referencia [74].

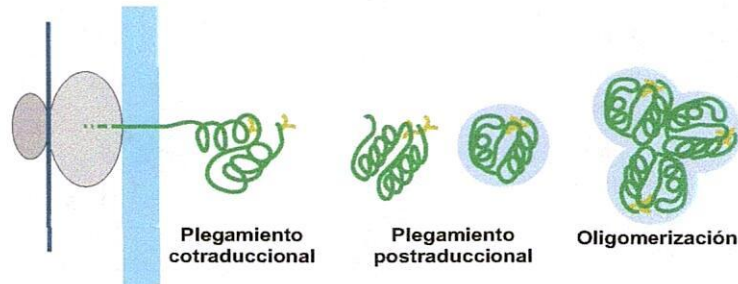
A diferencia del caso cotraduccional, para la translocación postraduccional a través de la membrana del RE, en la literatura no existen valores reportados para la tasa o velocidad de translocación. En bacterias, la translocación postraduccional ocurre del citoplasma al periplasma, asistida por la ATPasa SecA, una proteína citosólica perteneciente a la familia de las RecA [74]. SecA se asocia con el canal conductor de proteínas, el complejo SecY, promoviendo la translocación mediante cambios conformacionales de sus dominios por la hidrólisis de ATP [70, 81, 74]. De experimentos en sistemas diluidos *in vitro*, utilizando proteoliposomas y vesículas de membrana invertida que contienen al complejo SecY, la velocidad de translocación postraduccional ha resultado ser constante, de 0.8–8 aa/s [31, 101, 51]. Estas velocidades serán utilizadas como valores de referencia para la translocación postraduccional en un ambiente diluido.

## 1.2. Retrotranslocación a través de la membrana del retículo endoplásmico

Las preproteínas que atraviesan la membrana del retículo endoplásmico están destinadas a convertirse en proteínas de membrana, proteínas lumenales, o proteínas de secreción. Para convertirse en proteínas, en el lumen existen chaperonas que asisten el plegamiento de cadenas peptídicas, la oligomerización (el ensamble de subunidades múltiples de proteínas), la glicosilación (agregación de hidratos de carbono) y la formación de enlaces disulfuro [21, 39]. Los diferentes tipos de chaperonas conocidas en el lumen son [94]: 1) proteínas de la familia Hsp70 que asisten el plegamiento y evitan la agregación, 2) proteínas de la familia Hsp40 que promueven la actividad ATPasa de las proteínas Hsp70, 3) los factores de intercambio de nucleótidos que promueven el intercambio de ADP y ATP, el cual es necesario para el replegamiento de las Hsp70, 4) proteínas de la familia Hsp90, que tienen un dominio de unión para el ATP, necesario para la hidrólisis, 5) las proteínas pequeñas Hsp, que se adhieren a sustratos de proteínas y previenen la agregación irreversible, 6) proteínas tipo lectinas que se adhieren a sustratos glicosilados, y 7) proteínas oxido reductasas de tioles que toman parte en la formación de enlaces disulfuro, el plegamiento, y el redireccionamiento de proteínas mal plegadas.

El plegamiento en el lumen del RE para una preproteína puede ocurrir durante la translocación, de forma cotraduccional o postraduccional, ver Figura 1.3. Si el plegamiento ocurre durante la translocación, entonces empieza por los aminoácidos más cercanos al extremo N terminal, debido a que una preproteína entra al canal proteico por su extremo N terminal en forma de U [39, 47]. En el lumen del RE, cuando la preproteína se encuentra completamente translocada, continúa el proceso de plegamiento de la cadena, y eventualmente, ocurre la oligomerización, donde diferentes subunidades se unen para formar una sola estructura, ver Figura 1.3. En el lumen, para facilitar el plegamiento de proteínas, se realiza la glicosilación y se promueve la formación de enlaces disulfuro. Los glicanos adicionan hidrofobicidad a un polipeptido, sirviendo como sustratos para chaperonas lectinas, mientras que la formación de enlaces disulfuro le permiten a una proteína alcanzar una de sus conformaciones nativas [92]. La gran variedad de proteínas que existen en el lumen del RE para asistir el plegamiento, son translocadas a través de la membrana del RE, como Ero1p, una proteína oxido reductasa de 560 aminoácidos que asiste la formación de enlaces disulfuro [92, 38].

Cuando una preproteína después de la translocación no logra plegarse de manera correcta, debe mandarse de regreso al citoplasma para su degradación, proceso conocido como retrotranslocación o dislocación [92, 94]. El mal plegamiento de una proteína se debe a las condiciones del medio, a mutaciones en las proteínas, al estrés celular, entre otros [92, 94]. Las proteínas de secreción que entran al RE deben plegarse correctamente en el lumen antes de continuar la ruta de secreción. Si una proteína de secreción está mal plegada o plegada parcialmente es impedida de seguir la ruta de secreción. La proteína es rete-



**Figura 1.3:** Plegamiento cotraduccional y postraduccional. Imagen adaptada de la referencia [39].

nida para conseguir el plegamiento correcto [92] o es retrotranslocada para ser degradada por proteosomas en el citoplasma [65]. En caso de que exista una alta acumulación de proteínas retenidas, se genera una predisposición a formar agregados [58], los cuales, pueden causar enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson, o la enfermedad de Creutzfeld-Jacob [94]. Para evitar la acumulación de proteínas mal plegadas, se genera una serie de señales adaptivas de la célula, conocida como respuesta de mal plegamiento de proteínas, que incluye la transcripción, traducción y translocación de proteínas para aumentar la capacidad de plegamiento en el lumen [58]. En caso de que el problema de mal plegamiento no se resuelva después de una serie de señales de mal plegamiento, se programa un tipo de muerte celular conocida como apoptosis [92, 58].

Para realizar la retrotranslocación, en el lumen del RE, las chaperonas distinguen las proteínas mal plegadas al sensar, mediante interacciones, las regiones hidrofóbicas expuestas, las cisteínas disparejas que no han formado enlaces disulfuro y los glicanos inmaduros [92]. Este proceso de distinción, que permite retener proteínas mal plegadas y continuar la secreción de proteínas plegadas correctamente, se conoce como control de calidad del retículo endoplásmico [92, 58]. Las proteínas identificadas como mal plegadas, se mantienen en un estado soluble y son retrotranslocadas al citoplasma para su degradación, mediante el proceso de degradación asociada con el retículo endoplásmico (ERAD) [94].

El número total de proteínas retrotranslocadas puede ser una cantidad no despreciable, tomando en cuenta primero, que aproximadamente un 20 % de las proteínas citosólicas son degradadas por no plegarse correctamente, y segundo, del total de las proteínas celulares, aproximadamente un 30 % corresponde a proteínas de secreción [65, 94], proteínas que deben ser translocadas. El lumen del RE es un ambiente muy sensitivo a condiciones ambientales ofensivas que afectan las reacciones que favorecen el plegamiento [58]. Por lo tanto, el proceso de retrotranslocación es un mecanismo de respuesta importante para evitar la acumulación de un gran número de proteínas mal plegadas, que pueden conllevar a la muerte de la célula.

### 1.3. El canal de transporte

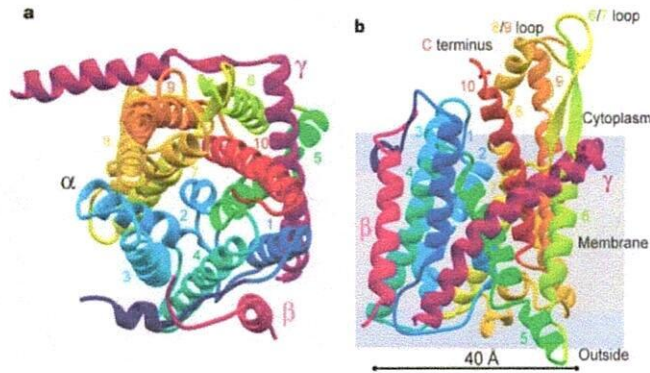
El canal que atraviesan las preproteínas para ingresar al lumen del RE, se encuentra embebido en la membrana del retículo endoplásmico. El canal es un complejo proteico heterotrimérico, llamado complejo Sec61 para eucariontes y complejo SecY para bacterias y arqueas [74]. El complejo proteico, referido como canal conductor de proteínas [104], está formado por tres subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  [74]. Las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  son esenciales para la translocación y presentan conservación en sus secuencias. La subunidad  $\beta$  no presenta conservación, en eucariontes y en arqueas consiste de un solo segmento transmembrana, mientras que en bacterias, consiste de un segmento que atraviesa la membrana dos veces [70]. La subunidad  $\beta$  tampoco resulta esencial para el proceso de translocación [70, 74]. La subunidad  $\gamma$ , en la mayoría de las especies, consiste de un segmento transmembrana con su extremo terminal N en el citosol, mientras que en algunas eubacterias como *Escherichia coli* tiene dos segmentos transmembrana adicionales, no esenciales para su funcionamiento [70]. La subunidad más grande es la  $\alpha$ , y consiste de 10 segmentos transmembrana con sus extremos terminales N y C en el citoplasma [70]. La subunidad  $\alpha$  forma el canal por donde atraviesan las preproteínas [14, 74].

#### 1.3.1. Estructura del canal conductor de proteínas

La estructura del canal de translocación de *Methanococcus jannaschii* obtenida mediante rayos X con una resolución de 3.2 Å, fue publicada por van den Berg *et al.* en 2004 [104]. La subunidad  $\alpha$  está dividida en dos partes, cada una formada por cinco segmentos transmembrana (TM), los segmentos del uno al cinco (TM1-5) y los segmentos del seis al diez (TM6-10), ambas partes se encuentran conectadas por un rizo que une los segmentos TM5 y TM6, por atrás de la subunidad. Después del segmento TM1, se encuentra un rizo largo que termina con un pequeño segmento en forma de hélice distorsionada, llamado TM2a, este se encuentra orientado hacia el centro de la subunidad. La subunidad  $\beta$ , inicia con un segmento desordenado en el citoplasma, pasa sobre el extremo terminal N de la subunidad  $\alpha$ , y continua de forma perpendicular a través de la membrana, pasando cerca del extremo terminal C de la subunidad  $\gamma$  al otro lado de la membrana. El contacto entre la subunidad  $\beta$  y la subunidad  $\alpha$  es limitado. La subunidad  $\gamma$  consiste de dos hélices conectadas por una pequeña hebra  $\beta$  capaz de formar una lámina con la horquilla  $\beta$  de los segmentos transmembrana seis y siete de la subunidad  $\alpha$ . La subunidad  $\gamma$  atraviesa la membrana en un ángulo de 35° respecto del plano de la membrana, haciendo contacto con las dos partes de la subunidad  $\alpha$  por medio de TM1, TM5, TM6 y TM10. De esta manera, la subunidad  $\gamma$  mantiene unidas las dos partes de la subunidad  $\alpha$  [104], ver la Figura 1.4.

En la Figura 1.4, se muestra la representación estereográfica del canal conductor de proteínas de *M. jannaschii*, el complejo SecY. La Figura presenta al canal visto desde la parte superior de la membrana y de forma lateral. En la Figura, aparecen los 10 segmentos transmembrana de la subunidad  $\alpha$ , la subuni-

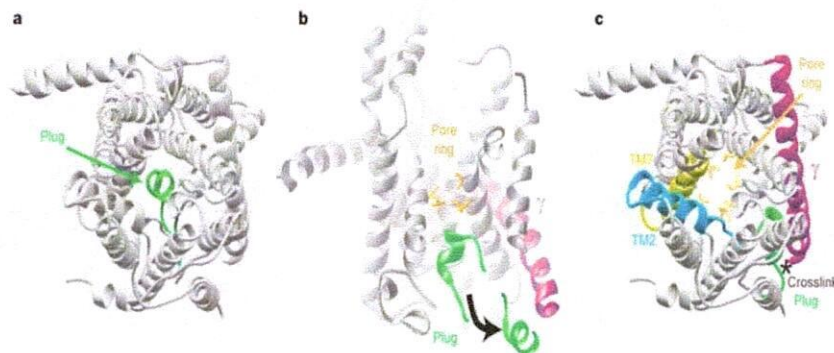
dad  $\gamma$  aparece inclinada transversal a la membrana, y la subunidad  $\beta$ , se muestra manteniendo contacto limitado con la unidad  $\alpha$ .



**Figura 1.4:** Representación estereográfica del canal conductor de proteínas SecY de *M. jannaschii*. a) Vista la parte superior de la membrana. b) Vista lateral a la membrana. Imagen tomada de la referencia [104].

La subunidad  $\alpha$ , por donde atraviesan las preproteínas durante la translocación, presenta una estructura similar a la cavidad generada por un reloj de arena. Del lado del citoplasma, aparece una cavidad en forma de embudo con un diámetro aproximado de 20–25 Å [104]. El ancho de la cavidad se reduce a un mínimo a la mitad de la membrana, donde existe un anillo formado por seis aminoácidos hidrófobos. La abertura del anillo es de aproximadamente 5–8 Å [104]. Del otro lado de la membrana, la cavidad también tiene forma de embudo, y cerca del anillo, se encuentra la hélice TM2a que funciona como un tapón al mantener impermeable a la membrana [104, 74]. El tapón tiene la capacidad de desplazarse durante la translocación para permitir el paso de una preproteína [74].

En la Figura 1.5a, se muestra la posición del tapón formado por la hélice TM2a. La dirección del desplazamiento del tapón se indica en la Figura 1.5b, y su posición durante la translocación se indica en la Figura 1.5c. Adicionalmente, en la Figura 1.5b, se aprecia la cavidad en forma de embudo de la subunidad  $\alpha$ .



**Figura 1.5:** Canal conductor de proteínas de *M. jannaschii* y su tapón formado por la hélice TM2a. a) Posición del tapón antes de desplazarse. b) Dirección del desplazamiento del tapón. c) Posición del tapón durante la translocación. Imagen tomada de la referencia [104].

## 1.4. Abarrotamiento intracelular y el efecto sobre las proteínas

### El medio intracelular en un medio abarrotado por proteínas

Durante la translocación y la retrotranslocación, una preproteína tiene segmentos en ambos lados de la membrana, el citoplasma y el lumen del retículo endoplásmico. En ambos medios, existe una gran variedad de especies moleculares. De todas las especies, las macromoléculas más abundantes son las proteínas. La concentración total de proteínas en el citoplasma o en el lumen del RE se encuentra por arriba del régimen diluido, en el cual, la concentración total de los solutos es menor a 10 mg/ml [29, 30]. La concentración de proteínas en el citoplasma se encuentra en el intervalo de 100–320 mg/ml, y en el lumen del RE entre 100–200 mg/ml, ver Sección 5.1. Para expresar la ocupación de proteínas en el medio intracelular, se utiliza la fracción del volumen. Para el citoplasma, la fracción de volumen que ocupan las proteínas está entre 0.12–0.38, y para el lumen del RE está entre 0.12–0.24, ver Sección 5.1. Estos valores de concentración y de fracción de volumen, definen al medio intracelular como un medio abarrotado por proteínas.

### Efecto del abarrotamiento por proteínas sobre las propiedades de una proteína

Las propiedades físicas y químicas de una proteína en un medio diluido pueden ser diferentes de las propiedades en un medio abarrotado por proteínas. Entre las cantidades afectadas por el abarrotamiento por proteínas, se encuentran el coeficiente de difusión, la renaturalización, los coeficientes de actividad

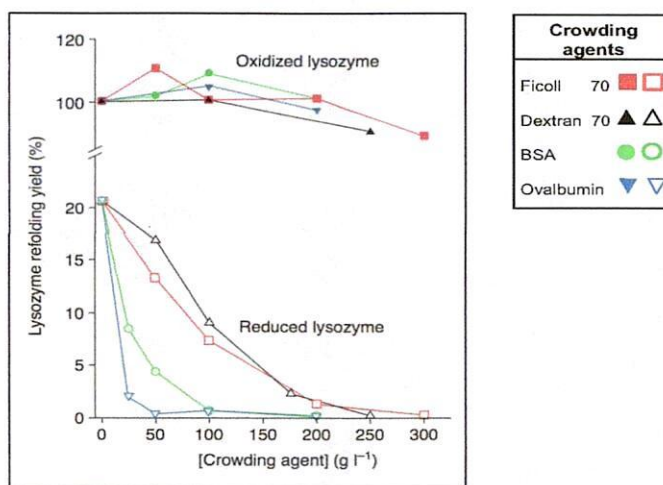
química, y la formación de estructuras durante el plegamiento. Estas cantidades medidas experimentalmente, son de interés biológico por tratarse de proteínas, las cuales desempeñan sus funciones en el abarrotado medio intracelular. A continuación, indicamos por separado los efectos del abarrotamiento sobre proteínas.

El coeficiente de difusión de la proteína fluorescente verde (GFP) medido en agua, un ambiente diluido, es  $D = 87 \mu\text{m}^2/\text{s}$  [24]. Cuando el coeficiente de difusión fue medido en el interior de células eucariotas de la línea CHO, el coeficiente para el citoplasma resultó entre  $25\text{--}30 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , mientras que para el lumen del RE resultó entre  $5\text{--}10 \mu\text{m}^2/\text{s}$  [24]. Estos valores comparados con el coeficiente de difusión en agua, corresponden a una reducción de entre tres a seis veces para el citoplasma y de entre nueve a 18 veces para el lumen del RE.

En *E. coli*, una célula procariota, el coeficiente de difusión de la GFP fue medido como función de la concentración de macromoléculas en el citoplasma [45, 46]. El coeficiente de difusión resulta sensitivo a la forma en que cambia la concentración, y disminuye al aumentar la concentración. En células adaptadas, el coeficiente de difusión de la GFP a una fracción de volumen de 0.15, es  $D = 12.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , cuando la fracción de volumen aumenta hasta 0.36, el coeficiente se reduce a la mitad,  $6.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  [46]. Otros trabajos experimentales en soluciones abarrotadas por proteínas o polímeros, a concentraciones fisiológicas, muestran comportamientos similares para el coeficiente de difusión como función de la concentración [23, 5, 25].

El abarrotamiento puede modificar el plegamiento. Van den Berg *et al.* estudiaron la renaturalización de la lisozima de gallina desnaturalizada en ambientes abarrotados a condiciones fisiológicas [103]. Como agentes abarrotantes, utilizaron los polisacáridos Ficoll 70 y dextran 70, agentes inertes y altamente solubles de masa molecular  $\approx 70$  kDa, y también utilizaron las proteínas albúmina del suero de bovino (BSA) y albúmina de pollo (ovalbúmina). La renaturalización se estudió para la lisozima desnaturalizada en su estado oxidado y en su estado reducido. De los resultados, la renaturalización de la lisozima desnaturalizada en sus estado oxidado ocurre al 100%, independientemente de la concentración y del tipo de agente abarrotante, ver Figura 1.6. La renaturalización de la lisozima desnaturalizada en su estado reducido disminuye al aumentar la concentración del agente abarrotante, como lo indica la Figura 1.6, donde se indica el porcentaje de proteína renaturalizada como función de la concentración del agente abarrotante. Para cualquiera de los agentes abarrotantes, existen valores de concentración a la cual se suprime la renaturalización, este efecto del abarrotamiento es más notorio cuando los agentes abarrotantes son proteínas, como se aprecia en las dos curvas de la parte superior de la Figura 1.6. Van den Berg *et al.* también estudiaron el efecto del abarrotamiento en la actividad catalítica de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) sobre la renaturalización de la lisozima reducida [103]. La PDI es una proteína que cataliza la formación de enlaces disulfuro en el lumen del RE. Para estudiar la actividad de la PDI, después de la renaturalización de la lisozima desnaturalizada en su estado reducido en ambos, un ambiente diluido y un ambiente abarrotado, se agregó PDI y se analizó la nueva cantidad de proteína renaturalizada. Cuando la concentración

de PDI aumenta hasta  $12.5 \mu\text{M}$ , el porcentaje de proteína renaturalizada en un ambiente diluido se incrementa en  $\approx 20\%$ , mientras que en un ambiente abarrotado, la renaturalización se incrementa en  $30\%$  y en  $40\%$  para los agentes abarrotantes Ficoll 70 a una concentración de  $200 \text{ mg/ml}$  y la proteína BSA a  $100 \text{ mg/ml}$ , respectivamente. Bajo las condiciones de abarrotamiento utilizadas, similares a las condiciones de abarrotamiento fisiológicas, la actividad catalítica de la proteína disulfuro isomerasa aumenta.



**Figura 1.6:** Porcentaje de lisozima renaturalizada en un ambiente abarrotado por polisacáridos o por proteínas. Los marcadores sólidos corresponden a la lisozima oxidada y los marcadores vacíos a la lisozima reducida. Imagen tomada de la referencia [30].

El abarrotamiento también puede afectar la dinámica del plegamiento al nivel de estructuras secundarias y terciarias. Mukherjee *et al.* estudiaron el efecto del abarrotamiento sobre la dinámica del plegamiento de tres motivos básicos, una hélice  $\alpha$ , una hélice-giro-hélice, y una horquilla  $\beta$  [63]. Los dos motivos de hélices constan de 34 aminoácidos, y el motivo de horquilla  $\beta$  es más pequeño y consta de 16 aminoácidos. Los agentes abarrotantes utilizados fueron Ficoll 70 y Dextran 70 a una concentración de  $200 \text{ mg/ml}$ . En sus resultados, la razón de plegamiento de los motivos hélice  $\alpha$  y hélice-giro-hélice no cambia significativamente por el abarrotamiento comparada con la razón de plegamiento en un ambiente diluido. Para el motivo horquilla  $\beta$ , la razón de plegamiento es reducida por el abarrotamiento, con una reducción mayor por abarrotamiento con Ficoll 70. Este efecto del abarrotamiento se debe a dos factores, a la forma del agente abarrotante y al aumento en la viscosidad del medio, este último, genera una mayor fricción sobre el péptido en plegamiento [63]. Durante el plegamiento, los cambios conformacionales para formar una hélice son locales, a diferencia del

caso de la horquilla  $\beta$  donde se requieren cambios conformacionales no locales para cerrar la horquilla, esto hace que el efecto del abarrotamiento sea más pronunciado sobre la formación de la estructura secundaria horquilla  $\beta$ , a pesar de su tamaño [63].

Al nivel de estructura terciaria, Tokuriki *et al.* estudiaron el efecto del abarrotamiento sobre el tamaño de la proteína ribonucleasa A (RNasa A) renaturalizada. Para ello, compararon el espectro de dicroísmo circular (CD) de la RNasa A naturalizada y desnaturalizada en un ambiente diluido, con el espectro en condiciones de abarrotamiento con Ficoll 70 y con polietilenglicol 20000 (PGE de  $\approx 20$  kDa). Cuando la RNasa A se encuentra en una solución diluida con urea a 2.4 M, el 70 % de la proteína se encuentra desplegada, si la solución tiene urea a 0.2 M, el total de la proteína se encuentra en su estructura nativa. Al agregar agentes abarrotantes a la solución con urea a 2.4 M, el espectro de CD de la RNasa A cambia, y para una ocupación del 35 % de PGE 20000 o de Ficoll 70, el espectro se vuelve muy similar al obtenido cuando la RNasa A se encuentra en su estructura nativa. Este resultado indica que el abarrotamiento favorece la compactación de la RNasa A, y por lo tanto, se favorece la formación al nivel de estructura terciaria. Para determinar si el abarrotamiento promueve el plegamiento de la RNasa A hasta su estructura nativa, Tokuriki *et al.* analizaron la actividad enzimática. La RNasa A en un ambiente diluido reduce su actividad enzimática al incrementar la concentración de urea. La actividad de la RNasa A cuando la concentración de urea aumenta hasta 2.4 M es de un 5 %. Al agregar agentes abarrotantes a dicha solución, la actividad de la RNasa A se incrementa hasta un 25 % cuando la ocupación de los abarrotantes es de 30 %. Este resultado indica que el abarrotamiento favorece la formación de estructuras proteicas similares a la estructura nativa terciaria [63].

En esta sección se ha mencionado el efecto del abarrotamiento sobre diferentes propiedades de una proteína. La mayoría de los estudios, realizados en soluciones abarrotadas por polímeros o proteínas, utilizan valores de concentración similares a las condiciones de abarrotamiento fisiológico, con el objetivo de conocer el comportamiento y funcionamiento de las proteínas en el abarrotado medio intracelular. Durante la translocación y retrotranslocación, una preproteína tiene segmentos en ambos lados de la membrana, en el citoplasma y el lumen del RE, ambos medios abarrotados principalmente por proteínas. El efecto del abarrotamiento por proteínas sobre la translocación de una preproteína en el medio intracelular no ha sido estudiado debido al tamaño del sistema de translocación (de unos cuantos nanómetros), y al limitado control de las diferentes etapas de la translocación, mediadas por las velocidades de las reacciones involucradas.

Para estudiar uno de los efectos del abarrotamiento sobre la translocación postraduccional, utilizamos modelos estéricos de polímeros, los cuales indican una clara diferencia entre la translocación en un ambiente diluido y en un ambiente abarrotado, como se indica a continuación.

## 1.5. Modelos de translocación para polímeros

El estudio en la literatura de la translocación se ha enfocado en describir el transporte a través de la membrana, desde el arribo de una preproteína y su inserción al canal, hasta su liberación cuando la preproteína ha cruzado completamente la membrana. Para estudiar la translocación, se han utilizado los componentes necesarios de la translocación, como el canal conductor de proteínas, el complejo Sec, y las chaperonas y moléculas que asisten la translocación. El sistema está formado por proteoliposomas, microsomas, o vesículas de membrana invertida, en un ambiente diluido. Estudiar el efecto del abarrotamiento por proteínas sobre la translocación de una preproteína es un proceso complejo debido a la escala del sistema, y a las interacciones entre la preproteína con las especies abarrotantes.

El efecto estérico del abarrotamiento sobre la translocación se puede estudiar utilizando modelos que toman en cuenta la reducción de las conformaciones de un polímero en translocación por la presencia de la membrana y de los agentes que abarrotan. El efecto del abarrotamiento sobre la translocación de un polímero se cuantifica al comparar las variables de la translocación en un sistema abarrotado con las variables en un sistema sin abarrotar, denotado como sistema diluido. En estos modelos, la presencia de la membrana y el anclaje al poro impiden que el polímero acceda a todos sus posibles conformaciones comparadas con las de un polímero en el espacio libre. Este impedimento en las conformaciones, llamado impedimento estérico, modifica la energía libre del polímero, y por lo tanto, el efecto de la presencia de la membrana o de los agentes abarrotantes se incluye como una interacción estérica. Los modelos de translocación de polímeros consideran a la membrana como una pared impenetrable, con un poro que permite el paso del polímero, similar al proceso de translocación de una preproteína a través de una membrana.

La translocación de un polímero en un ambiente diluido fue estudiada por Sung y Park [96]. En sus resultados, la presencia de la pared introduce una barrera de energía dependiente del tamaño del polímero, y puede modificarse introduciendo potenciales químicos. Debido a la barrera de energía, el tiempo de translocación resulta mayor al tiempo que por difusión se tardaría un polímero en recorrer una distancia igual a su longitud. El tiempo de translocación  $\tau_{\text{diff}}$  depende del tamaño de la cadena  $N$  y del coeficiente de difusión  $D$ , y es aproximadamente  $\frac{\pi^2}{8} \frac{(Nb)^2}{2D}$ , con  $b$  la longitud de monómero. En sus cálculos numéricos del tiempo, Sung y Park asumen que el coeficiente de difusión es el mismo en ambos lados de la membrana.

La translocación de un polímero en un ambiente abarrotado por agentes esféricos fue estudiada por Gopinathan y Kim [35]. Para estudiar el efecto del movimiento, consideran el abarrotamiento en dos casos límite, cuando los agentes se mueven muy rápido, llamado régimen dinámico, y cuando los agentes carecen de movimiento, llamado régimen estático. En sus cálculos, también asumen que el coeficiente de difusión es igual en ambos lados de la membrana. En sus resultados, el tiempo de translocación crece con la longitud de la cadena  $N$ , dependiendo de los valores de concentración en ambos lados de la membrana, el

tiempo puede crecer de manera exponencial, presentar un crecimiento asintótico en forma de meseta, o crecer con una ley de potencia. Las tres formas de crecimiento para el tiempo de translocación se presentan en ambos regímenes, estático o dinámico [35]. Este resultado para el tiempo de translocación, es diferente al obtenido por Sung y Park para la translocación en un ambiente diluido, y por lo tanto, representa un claro ejemplo del efecto estérico del abarrotamiento sobre la translocación de polímeros.

En este trabajo, estudiamos y caracterizamos el efecto estérico del abarrotamiento fisiológico por proteínas sobre la translocación y retrotranslocación postraduccional de una preproteína. Para ello, utilizamos modelos de polímeros, tomando en cuenta características físicas del medio intracelular, como la viscosidad intracelular, el coeficiente de difusión de proteínas en el citoplasma y en el lumen del RE, la longitud de las proteínas translocadas hacia el lumen del RE, y los valores de concentración de proteínas en el citoplasma y en el lumen del RE. Las características físicas del medio intracelular son incluidas en los modelos como parámetros, y nos permiten definir el tipo de abarrotamiento del medio intracelular.

En este capítulo, aunque se han mencionado las características principales de los procesos de translocación y retrotranslocación, en el trabajo de investigación se toma en cuenta únicamente la interacción energética estérica de una cadena debido a su entropía conformacional. Este trabajo se ha centrado en estudiar el efecto estérico del abarrotamiento y todas las demás interacciones, como la existente entre el agua y los aminoácidos de una proteína, no se incluyen en el modelo. Modelos para la translocación, incluyendo otro tipo de interacciones o fenómenos importantes para el proceso de translocación, se dejan como trabajo a futuro y se mencionan en las perspectivas.

## Capítulo 2

# Planteamiento del problema y objetivos de estudio

La translocación y la retrotranslocación de preproteínas son procesos vitales para las células. La translocación permite que las preproteínas experimenten el proceso de plegamiento para alcanzar una estructura nativa<sup>1</sup>, para después ser dirigidas a sitios específicos donde desempeñan sus funciones. Del total de proteínas, aproximadamente el 30 % deben ser translocadas por tratarse de proteínas de secreción. La retrotranslocación es un proceso de respuesta al mal plegamiento de proteínas en el lumen, y sirve para evitar la agregación de proteínas, fenómeno asociado con el desarrollo de enfermedades y con la muerte celular. El mal plegamiento de proteínas en el citoplasma y su degradación ocurre para aproximadamente el 20 % de las proteínas. Para el lumen, se espera una cantidad de la misma magnitud, debido a que es un ambiente sensitivo a condiciones ambientales ofensivas que afectan el plegamiento.

La translocación y la retrotranslocación de preproteínas ocurre entre el citoplasma y el lumen del RE; ambos entornos son ambientes abarrotados por proteínas. Una preproteína en transporte tiene segmentos en ambos medios, y por lo tanto, interacciona con las proteínas abarrotantes. De todas las interacciones, la interacción estérica siempre está presente. Las proteínas abarrotantes le excluyen volumen a los segmentos de una preproteína, reduciendo el número de conformaciones posibles. La reducción en conformaciones modifica la energía libre de la preproteína; este efecto por la exclusión de volumen del abarrotamiento de proteínas se modela como una interacción estérica.

Para llevar a cabo la translocación o la retrotranslocación, una preproteína debe encontrarse en un estado no plegado o de plegamiento parcial. Una proteína no plegada experimenta diferentes conformaciones para adquirir una estructura estable o estructura nativa. El número de conformaciones aumenta mientras la

---

<sup>1</sup>No todas las proteínas intracelulares alcanzan una estructura nativa. Existen proteínas que presentan segmentos desordenados y son capaces de desempeñar funciones al interactuar con otras proteínas. Estas proteínas son llamadas proteínas intrínsecamente desordenadas [4].

cadena sea impedida de alcanzar el plegamiento, como sucede durante la translocación [74]. Por simplicidad, consideramos que las conformaciones que experimenta una preproteína corresponden a las conformaciones de una cadena de polímero sin restricciones, llamada cadena ideal. De esta manera, la preproteína se reemplaza por un polímero o cadena ideal.

Para estudiar el efecto del abarrotamiento por proteínas sobre la translocación y retrotranslocación postraduccional de preproteínas a través de la membrana del retículo endoplasmático, utilizamos modelos estéricos de la translocación de polímeros. A continuación enunciamos todas las consideraciones sobre el sistema biológico de translocación que nos permiten utilizar modelos físicos.

Una preproteína en translocación, a fin de entrar al lumen del RE, atraviesa la membrana por el canal proteico conductor para no perturbar la permeabilidad de la membrana. El comportamiento de la preproteína en translocación es equivalente al de un polímero en translocación a través de una pared rígida delgada<sup>2</sup> por medio de un orificio de tamaño despreciable.

Si la translocación de una preproteína ocurre en un ambiente sin abarrotar, el sistema se llama diluido. Este tipo de sistemas es utilizado para estudiar la translocación en sistemas experimentales *in vitro*. La translocación en un ambiente diluido, utilizando modelos, se representa por la translocación de un polímero en ausencia de agentes abarrotantes.

En el medio intracelular, la preproteína en translocación se encuentra rodeada por las proteínas abarrotantes del citoplasma y el lumen del RE. Por simplicidad, consideramos que las proteínas abarrotantes son de la misma especie que la preproteína en translocación, de esta manera, el tamaño de los agentes abarrotantes  $a$  es igual al tamaño característico de la preproteína en translocación, dado por su radio de giro:  $R_g = \sqrt{\frac{N}{6}}b$ . Las proteínas abarrotantes se consideran como agentes esféricos de radio  $a = R_g$ , lo cual equivale a abarrotamiento por proteínas globulares, con una fracción de volumen  $\phi_{\text{cit}}$  en el citoplasma y  $\phi_{\text{RE}}$  en el lumen del RE. Debido al abarrotamiento, el sistema de translocación equivalente es el de un polímero en translocación en presencia de agentes esféricos distribuidos aleatoriamente.

En el medio intracelular las proteínas abarrotantes se mueven por difusión. Una preproteína en translocación, además del efecto de volumen excluido por abarrotamiento, experimenta el movimiento de las proteínas. La movilidad por difusión de las proteínas abarrotantes es diferente en el citoplasma y en el lumen del RE, debido al grado de abarrotamiento y a la viscosidad del medio, ver capítulo 5. La movilidad de una preproteína en translocación depende de la movilidad en el citoplasma y en el lumen del RE, y del grado de abarrotamiento. En consecuencia, la movilidad de una preproteína en translocación es menor a la movilidad de una proteína abarrotante; ver capítulo 5. Este comportamiento corresponde al de un polímero en translocación rodeado por agentes esféricos

---

<sup>2</sup>En la translocación en células, una preproteína debe atravesar por el canal conductor embebido en una membrana de grosor 6.7 nm [73]. El grosor de la membrana no es una cantidad despreciable, principalmente para preproteínas pequeñas. Consideraciones acerca del grosor de la membrana se plantean como trabajo a futuro en la Sección 8.3.

de alta movilidad; en este caso el sistema es llamado abarrotado en un régimen dinámico. Si las proteínas abarrotantes estuvieran inmóviles, lo cual no corresponde al abarrotamiento intracelular, la translocación equivalente sería la de un polímero rodeado por agentes esféricos inmóviles; este sistema es llamado abarrotado en un régimen estático.

Para estudiar el efecto estérico del abarrotamiento por proteínas sobre la translocación y la retrotranslocación de preproteínas, utilizamos modelos de translocación de polímeros. Estudiamos la translocación de un polímero en un sistema diluido, y en los sistemas con abarrotamiento dinámico y con abarrotamiento estático. El sistema diluido es utilizado como sistema de referencia para cuantificar el efecto estérico del abarrotamiento. Los sistemas abarrotados en un régimen dinámico y en un régimen estático son utilizados para estudiar el efecto de la movilidad de los agentes abarrotantes.

Las características físicas del medio intracelular son incluidas en los modelos como parámetros. Entre ellas, están la viscosidad del medio intracelular, el coeficiente de difusión de las proteínas que abarrotan el medio intracelular y la fracción de volumen que ocupan. También se toma en cuenta la longitud de las proteínas translocadas hacia el lumen del RE y la diferencia en la fracción de volumen de las proteínas que abarrotan el citoplasma y el lumen del RE.

## **2.1. Objetivos**

### **2.1.1. Objetivo general**

El objetivo principal de este trabajo es estudiar el efecto estérico del abarrotamiento por proteínas sobre las propiedades físicas de la translocación y retrotranslocación postraduccional de preproteínas a través de la membrana del retículo endoplásmico.

### **2.1.2. Objetivos particulares**

Para estudiar y cuantificar el efecto estérico del abarrotamiento por proteínas sobre la translocación, debemos cumplir una serie de objetivos particulares:

1.- Calcular, mediante modelos estéricos, las siguientes propiedades físicas: la energía libre, la energía de activación, la fuerza entrópica, y el tiempo de transporte, para la translocación y la retrotranslocación de un polímero en un ambiente diluido y en un ambiente abarrotado.

2.- Utilizar las propiedades físicas del medio intracelular: viscosidad, concentración de proteínas, y el coeficiente de difusión de proteínas, para calcular los tres tiempos característicos del sistema de translocación que nos permiten definir en que régimen se encuentra el medio intracelular abarrotado por proteínas, dinámico o estático, de acuerdo a la movilidad de las proteínas.

3.- Comparar las variables físicas de la translocación en un ambiente diluido con las de la translocación en un ambiente abarrotado dinámico, para cuantificar

el efecto estérico del abarrotamiento intracelular.

4.- Calcular las variables físicas de la translocación y la retrotranslocación como función de la diferencia de las fracciones de volumen  $\Delta\phi$  que ocupan las proteínas en el citoplasma y en el lumen del RE, para estudiar el efecto de tener diferentes concentraciones de proteínas en ambos lados de la membrana.

5.- Comparar las variables físicas de la translocación en un sistema abarrotado dinámico con las de un sistema abarrotado estático para determinar el efecto de la movilidad de los agentes abarrotantes sobre la translocación.

6.- Estudiar el efecto del abarrotamiento sobre el tiempo de translocación por medio del coeficiente de difusión, para cuantificar el doble efecto del abarrotamiento sobre el tiempo de translocación.

Para cumplir con nuestros objetivos, en los capítulos 3 y 4 presentamos la teoría para los modelos estéricos utilizados, y en los capítulos 5 y 6 mostramos los resultados.

## Capítulo 3

# Metodología: Modelos para el transporte de cadenas en membranas a través de poros

En este capítulo se retoma la teoría de cadenas ideales y los modelos de polímeros en translocación en un ambiente diluido y en ambientes abarrotados [26, 96, 35]. Las expresiones de la energía libre de cada modelo son aplicadas a la translocación y la retrotranslocación de preproteínas en el capítulo 5.

### 3.1. La cadena ideal en el espacio libre

Consideremos una cadena formada por  $N$  monómeros cada uno de longitud  $b$ , con vectores de posición respectivos  $\vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_N$ . Una conformación de la cadena estará dada por el conjunto de los vectores de posición de los monómeros  $C = \{\vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_N\}$ . Si la posición y la orientación de cualquier monómero de la cadena no se ven afectados por la presencia de los demás monómeros a lo largo de la cadena, entonces llamamos a la cadena ideal; en este caso, la cadena puede acceder a todas sus posibles conformaciones. Este modelo de cadena también es conocido como el modelo de cadena de goznes libres, en el cual la longitud de los enlaces entre monómeros es fija e igual a  $b$ , con orientación independiente e isotrópica en el espacio [33].

En una cadena, las interacciones entre monómeros vecinos a lo largo de la cadena se conocen como *interacciones de corto alcance*, y cuando existen interacciones entre un monómero con otros que se encuentran lejos a lo largo de la cadena, pero cercanos en el espacio, se conocen como *interacciones de largo alcance* [33]. Un ejemplo de interacción de largo alcance proviene del contacto entre dos monómeros alejados a lo largo de la cadena pero cercanos en el espacio,

los cuales no pueden atravesarse entre sí debido a su volumen. Esta interacción debido a la exclusión de volumen se conoce como estérica y en una cadena ideal es despreciable.

### 3.1.1. Cantidades promedio

En el espacio libre, una cadena ideal adopta todas sus posibles conformaciones. Para caracterizar sus propiedades, en lugar de referirnos a una conformación en particular, hablamos de cantidades que han sido promediadas sobre todas las conformaciones de la cadena. Los promedios se calculan utilizando un ensamble de cadenas.

La primer cantidad promedio asociada a una cadena ideal es el vector de extremo a extremo  $\langle \vec{R} \rangle$ , el vector que va de un extremo de la cadena situado en  $\vec{R}_1$  hasta el otro extremo en  $\vec{R}_N$ . El vector  $\langle \vec{R} \rangle$  es cero, ya que al promediar sobre un ensamble, por cada cadena que tenga vector de extremo a extremo  $\vec{r}$  existe otra apuntando en la dirección opuesta  $-\vec{r}$ .

El vector extremo a extremo, por ser nulo, no da información; por lo tanto, se utiliza la *distancia cuadrática media de extremo a extremo*  $\sqrt{\langle \vec{R}^2 \rangle}$ . El vector extremo a extremo  $\vec{R}$  escrito en términos de los vectores  $\vec{b}$ , que apuntan de la posición de un monómero a la posición del siguiente a lo largo de la cadena, es [37, 33]:

$$\vec{R} = \sum_{i=1}^{N-1} \vec{b}_i \quad (3.1)$$

del cual se obtiene:

$$\vec{R}^2 = \sum_{i=1}^{N-1} \vec{b}_i + 2 \sum_{i \neq j} \vec{b}_i \cdot \vec{b}_j = (N-1)b^2 + 2 \sum_{i \neq j} b^2 \cos(\theta_{ij}) \quad (3.2)$$

con  $\theta_{ij}$  el ángulo entre los vectores  $\vec{b}_i$  y  $\vec{b}_j$ . Al promediar sobre un ensamble, por ser ideal la cadena, los vectores  $\vec{b}$  apuntan en cualquier dirección por no existir correlación en la orientación, y por lo tanto,  $\langle \cos(\theta_{ij}) \rangle = 0$ . De esta manera para  $N$  grande se tiene:

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = Nb^2. \quad (3.3)$$

Para caracterizar al tamaño de la cadena, se utiliza el radio de giro  $R_g$ , que mide la distribución de monómeros alrededor del centro de masa de la cadena [26, 33], el cual está definido como:

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \langle (\vec{R}_i - \vec{R}_{CM})^2 \rangle \quad (3.4)$$

con el centro de masa dado por  $\vec{R}_{CM} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \vec{R}_i$ . Para cadenas con  $N \gg 1$  se tiene [33]:

$$R_g^2 \approx \frac{\langle \vec{R}^2 \rangle}{6} = \frac{Nb^2}{6} \quad (3.5)$$

o

$$R_g \approx \sqrt{\frac{N}{6}}b \quad (3.6)$$

esta cantidad es utilizada comúnmente para caracterizar el tamaño de proteínas globulares en ambientes diluidos.

El cálculo de los valores promedio para cantidades adicionales se facilita utilizando la función de probabilidad. Para una cadena ideal, la densidad de probabilidad  $P$  de que una cadena de  $N$  monómeros tenga vector de extremo a extremo  $\vec{R}$ , es [33]:

$$P_N(\vec{R}) \approx \left(\frac{2\pi Nb^2}{3}\right)^{-3/2} \exp\left(-\frac{3\vec{R}^2}{2Nb^2}\right). \quad (3.7)$$

Considere a  $\Omega(\vec{R})$  el número de conformaciones de la cadena con vector de extremo a extremo fijo  $R$ , y a  $\Omega_0$  el número de todas las conformaciones de la cadena, entonces la probabilidad de que la cadena tenga vector de extremo a extremo fijo  $\vec{R}$  es  $P_N(\vec{R}) = \Omega(\vec{R}, N)/\Omega_0$ . La energía libre para la cadena con vector de extremo a extremo  $\vec{R}$ , debido a la entropía por conformaciones es  $F_N = -TS$  con  $S = k_B \ln(\Omega(\vec{R}))$ . Al escribir  $\Omega$  en términos de la probabilidad dada por la ecuación 3.7, se obtiene [26]:

$$F_N(\vec{R}) = -k_B T \ln(\Omega_0 P_N(\vec{R})) = F_0 + \frac{3k_B T \vec{R}^2}{2Nb^2} \quad (3.8)$$

donde el término  $F_0$  contiene el término en  $\Omega_0$ , el cual es constante y no depende de  $\vec{R}$ .

En caso de que la cadena ideal esté restringida en sus conformaciones debido a confinamiento o por la exclusión de volumen por agentes externos, la energía libre de la cadena cambia entropicamente. En las siguientes secciones, discutimos el caso de una cadena que posee un extremo libre y otro extremo anclado a un poro en una pared rígida e impenetrable, en ausencia y en presencia de agentes llamados agentes abarrotantes.

### 3.2. Modelo para el transporte de una cadena ideal a través de un poro sobre una pared: el modelo diluido

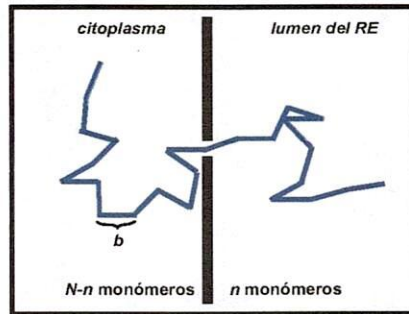
Durante la translocación y la retrotranslocación, proteínas que no han sufrido plegamiento o que presentan plegamiento parcial, se transportan entre el citoplasma y el lumen del RE. En este proceso, existen segmentos de la proteína

en ambos lados de la membrana, el citoplasma y el lumen del RE. Cada segmento tiene un extremo libre, mientras que el otro se encuentra anclado al canal de transporte; el canal debe permitir únicamente el paso de la cadena a fin de mantener la impermeabilidad de la membrana; por lo tanto, el ancho del canal es pequeño. En esta sección, indicamos el modelo de translocación de polímero que corresponde a la translocación en ausencia de agentes que obstaculicen el transporte, llamado modelo diluido.

### 3.2.1. Energía libre de una cadena ideal en translocación

Consideremos a una cadena ideal de  $N$  monómeros de longitud  $b$  atravesando un poro de tamaño despreciable sobre una pared plana, rígida e impenetrable (Figura 3.1). Definimos al estado inicial del transporte, en  $t = 0$  s, como el estado en el cual únicamente un monómero de la cadena ha cruzado; el proceso de inserción del primer monómero hacia el poro no será tomado en cuenta.

Al tiempo  $t$ , cuando  $n$  monómeros han atravesado, la cadena se considera como formada por dos segmentos de  $n$  y  $N - n$  monómeros, ambos anclados a la pared.



**Figura 3.1:** Cadena ideal reemplazando a un proteína sin plegar durante la translocación.

El proceso de transporte se describe utilizando los dos segmentos de la cadena a ambos lados de la pared. La energía libre  $\mathcal{F}$  de toda la cadena cuando  $n$  monómeros han atravesado es la suma de la energía libre  $F$  de cada segmento anclado [96]:

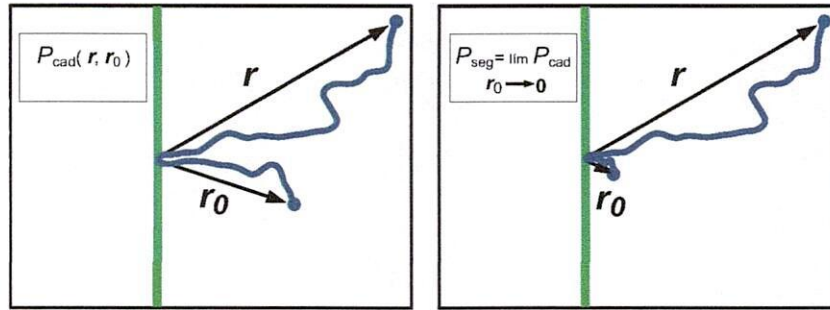
$$\mathcal{F}(n) = F(n) + F(N - n). \quad (3.9)$$

En la expresión anterior, se ha considerado que la forma funcional de la energía es la misma para los segmentos a ambos lados de la pared, ya que el medio es el mismo. En caso de que los medios alrededor de la pared, llamados lado *cis* y lado *trans*, sean diferentes, deben considerarse dos energías:  $F_{cis}(N - n)$  y  $F_{trans}(n)$ . La energía libre  $\mathcal{F}$  en la ecuación 3.9 representa la energía

promedio de un ensamble de cadenas cuando  $n$  monómeros han cruzado. Para conocer  $\mathcal{F}$ , primero indicamos la energía libre de un segmento anclado  $F$ .

### La densidad de probabilidad de un segmento de cadena

Para calcular la energía libre  $F$  de un segmento que se encuentra de un lado de la pared, utilizamos la densidad de probabilidad de un segmento con un extremo libre en  $\vec{r}$  y otro anclado en la pared,  $P_{\text{seg}}(\vec{r})$ . La densidad de probabilidad para el segmento,  $P_{\text{seg}}$ , se obtiene de la densidad de probabilidad de una cadena anclada a la pared con sus dos extremos libres en  $\vec{r}$  y  $\vec{r}_0$ :  $P_{\text{cad}}$ ; dicha cadena está restringida a un solo lado por la presencia de la pared. La probabilidad del segmento es la probabilidad de la cadena anclada en el límite en que uno de los extremos se aproxima al punto de anclaje en la pared; ver la Figura 3.2.

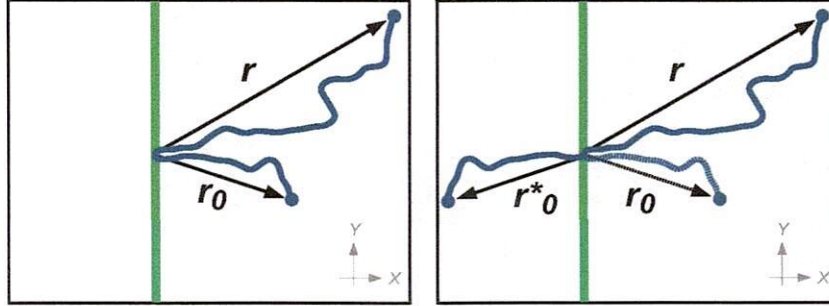


**Figura 3.2:** Izquierda: cadena anclada a la pared con sus extremos libres. Derecha: un segmento de cadena anclado corresponde al caso de la cadena anclada en el límite en que un extremo tiende al punto de anclaje.

Para el caso de la cadena anclada, cuyos extremos se encuentran en las posiciones  $\vec{r}$  y  $\vec{r}_0$ , la presencia de la pared restringe sus conformaciones. Por cada conformación de la cadena anclada con vector de extremo  $\vec{r}_0$ , existe una conformación restringida la cual corresponde a la conformación de una cadena con su extremo en  $\vec{r}_0^*$ , donde  $\vec{r}_0^*$  difiere del vector  $\vec{r}_0$  de la cadena anclada, en la coordena  $x$  que se reemplaza por  $-x$ , como se muestra en la Figura 3.3.

La probabilidad de una cadena anclada se obtiene de la probabilidad de una cadena ideal al tomar en cuenta las conformaciones impedidas por la pared. En ausencia de la pared, la probabilidad de tener a una cadena con extremos en  $\vec{r}$  y  $\vec{r}_0$  es la probabilidad de la cadena ideal en el espacio libre  $P_{\text{libre}}$  dada por la ecuación 3.7. Esta probabilidad, por complementaridad de probabilidades, es la suma de la probabilidad de una cadena anclada en la pared  $P_{\text{cad}}$  con extremos en  $\vec{r}$  y  $\vec{r}_0$ , más la probabilidad de una cadena que tiene vectores de extremo  $\vec{r}$  y  $\vec{r}_0$  pero que no está anclada  $P_{\text{no-ancla}}$ . La relación entre probabilidades es:

$$P_{\text{libre}}(\vec{r}, \vec{r}_0) = P_{\text{cad}}(\vec{r}, \vec{r}_0) + P_{\text{no-ancla}}(\vec{r}, \vec{r}_0). \quad (3.10)$$



**Figura 3.3:** Izquierda: cadena anclada a la pared con sus extremos libres en  $\vec{r}$  y  $\vec{r}_0$ . Derecha: cadena que representa la conformación impedida a la cadena anclada por la presencia de la pared. El extremo en  $\vec{r}_0^*$  difiere del vector  $\vec{r}_0$  de la cadena anclada en la coordenada  $x$ , la cual se reemplaza por  $-x$ .

Las conformaciones de la cadena no anclada corresponden a las conformaciones impedidas a la cadena anclada por la presencia de la pared, las cuales corresponden a la de una cadena ideal con vectores de extremo  $\vec{r}$  y  $\vec{r}_0^*$ ; por lo tanto, la probabilidad de la cadena no anclada es la probabilidad de una cadena ideal con extremos en  $\vec{r}$  y  $\vec{r}_0^*$ . Dejando la probabilidad de la cadena no anclada en términos de la probabilidad de una cadena ideal y despejando de la ecuación anterior, se encuentra para la probabilidad para la cadena anclada [96]:

$$P_{\text{cad}}(\vec{r}, \vec{r}_0) = P_{\text{ideal}}(\vec{r} - \vec{r}_0) - P_{\text{ideal}}(\vec{r} - \vec{r}_0^*). \quad (3.11)$$

En la ecuación anterior, los términos para la probabilidad de la cadena ideal se evaluaron en  $\vec{r} - \vec{r}_0$  y en  $\vec{r} - \vec{r}_0^*$ , respectivamente, ya que la probabilidad de la cadena ideal depende del vector que apunta de un extremo de la cadena hacia el otro, como aparece en la ecuación 3.7.

Con la probabilidad  $P_{\text{cad}}$ , la probabilidad de un segmento anclado en la pared  $P_{\text{seg}}$  se obtiene al tomar el límite cuando el extremo  $\vec{r}_0$  de la cadena anclada tiende a cero. Para ello, tomamos a un extremo de la cadena anclada como  $\vec{r} = (x, y, z)$ , y para el otro extremo  $\vec{r}_0 = (x_0, 0, 0)$  con  $x_0$  pequeño tendiendo a cero. De esta manera, la densidad de probabilidad de un segmento anclado de  $k$  monómeros, con el extremo libre en  $\vec{r}$ , y el otro extremo a una distancia  $x_0$  de la pared, se calcula como:

$$P_{\text{seg}}(\vec{r}; k) = P_{\text{cad}}(\vec{r}, \vec{r}_0) |_{\vec{r}_0=(x_0,0,0)} = [P_{\text{ideal}}(\vec{r} - \vec{r}_0) - P_{\text{ideal}}(\vec{r} - \vec{r}_0^*)]_{\vec{r}_0=(x_0,0,0)} \quad (3.12)$$

$$\begin{aligned}
P_{\text{seg}}(\vec{r}; k) &= \left(\frac{2\pi kb^2}{3}\right)^{-3/2} \exp\left(-\frac{3}{2kb^2}((x-x_0)^2 + y^2 + z^2)\right) \\
&\quad - \left(\frac{2\pi kb^2}{3}\right)^{-3/2} \exp\left(-\frac{3}{2kb^2}((x+x_0)^2 + y^2 + z^2)\right).
\end{aligned} \tag{3.13}$$

Al simplificar la expresión anterior se obtiene:

$$P_{\text{seg}}(\vec{r}; k) = \left(\frac{2\pi kb^2}{3}\right)^{-3/2} 2 \sinh\left(\frac{6xx_0}{2kb^2}\right) \exp\left(-\frac{3}{2kb^2}(x^2 + y^2 + z^2 + x_0^2)\right) \tag{3.14}$$

Utilizando el desarrollo en serie de la función seno hiperbólico alrededor de  $x_0 = 0$ , y tomando términos a primer orden en  $x_0$ , se obtiene [96]:

$$P_{\text{seg}}(\vec{r}; k) = \left(\frac{2\pi kb^2}{3}\right)^{-3/2} \frac{6xx_0}{kb^2} \exp\left(-\frac{3}{2kb^2}(x^2 + y^2 + z^2)\right). \tag{3.15}$$

La expresión anterior representa la densidad de probabilidad para que un segmento de cadena de  $k$  monómeros tenga vector de extremo  $\vec{r} = (x, y, z)$  mientras el otro se encuentra en  $x_0$  cercano a la pared. La probabilidad de encontrar un segmento con un extremo cercano a la pared en  $x_0$  y con su otro extremo en cualquier punto del espacio (con la restricción de que  $x > 0$  debido a que no puede atravesar la pared) se obtiene al integrar la expresión anterior sobre el espacio, con la restricción de que  $x > 0$  [96]:

$$P_{\text{seg}}(k) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\infty} \left(\frac{2\pi kb^2}{3}\right)^{-3/2} \frac{6xx_0}{kb^2} \exp\left(-\frac{3}{2kb^2}(x^2 + y^2 + z^2)\right) dx dy dz. \tag{3.16}$$

El resultado, en términos del número de monómeros  $k$  del segmento, es:

$$P_{\text{seg}}(k) = \left(\sqrt{\frac{6}{\pi}} \frac{x_0}{b}\right) k^{-1/2}. \tag{3.17}$$

### La energía libre de un segmento de cadena ideal anclado

La energía libre para un segmento de cadena de  $k$  monómeros anclado a la pared se obtiene a partir de su probabilidad. Si  $\Omega$  es el número de conformaciones del segmento anclado de  $k$  monómeros y  $\Omega_0$  el número de conformaciones del segmento en el espacio libre, entonces  $P_{\text{seg}}(k) = \Omega(k)/\Omega_0$ . La energía libre del segmento anclado tomando en cuenta las conformaciones es  $F_{\text{seg}}(k) = -k_B T \ln(\Omega)$ . Al escribir  $\Omega$  en términos de la probabilidad  $P_{\text{seg}}(k)$  dada por la ecuación 3.17, la energía libre se calcula como:

$$F(k) = -k_B T \ln(\Omega_0 P_{\text{seg}}(k)) = -k_B T \ln\left(\Omega_0 \left(\sqrt{\frac{6}{\pi}} \frac{x_0}{b}\right) k^{-1/2}\right) = F_0 + \frac{1}{2} k_B T \ln(k). \quad (3.18)$$

En la expresión anterior, el término  $F_0 = -k_B T \ln\left(\Omega_0 \sqrt{\frac{6}{\pi}} \frac{x_0}{b}\right)$  no depende del número de monómeros de la cadena, por lo tanto, es constante y puede tomarse como el nivel de referencia de la energía. De esta manera, la energía libre de un segmento de cadena de  $k$  monómeros anclado a la pared es [96]:

$$F(k) = \frac{1}{2} k_B T \ln(k). \quad (3.19)$$

Para una cadena ideal en translocación, compuesta por  $N$  monómeros, la energía libre de la cadena  $\mathcal{F}$  cuando  $n$  monómeros han atravesado la pared se obtiene de la suma de las energías de los segmentos de cadena que se encuentran a cada lado de la pared, compuestos de  $n$  y  $N - n$  monómeros respectivamente, esto es:

$$\mathcal{F}(n) = F(n) + F(N - n) = \frac{1}{2} k_B T \ln((N - n)n). \quad (3.20)$$

Esta expresión representa la energía libre promedio de una cadena ideal cuando  $n$  monómeros se encuentran de un lado de la pared. Nosotros utilizamos esta expresión para definir la fuerza asociada a la translocación de una cadena en un ambiente diluido y para calcular el tiempo promedio de primer paso de una cadena en translocación en el capítulo 6.

### 3.3. Modelo de transporte para una cadena en un ambiente abarrotado por agentes esféricos sin movimiento: el modelo abarrotado estático

Durante la translocación de una proteína en el medio intracelular, los segmentos de la proteína a ambos lados de la membrana se encuentran rodeados por diferentes moléculas, principalmente proteínas del citoplasma y del lumen del RE. La concentración de las proteínas en dichos medios está entre 100 y 320 mg/ml, por lo tanto se definen como medios abarrotados.

El movimiento de las proteínas solubles en el interior de las células ocurre principalmente por difusión, la cual disminuye al aumentar el tamaño de la proteína y el grado de abarrotamiento del medio. En el citoplasma y en el lumen del RE, la difusión de las proteínas es del orden de  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  (ver Sección 5.2). Modelar el proceso de translocación tomando en cuenta el movimiento por difusión de las proteínas que abarrotan el medio, resulta un proceso complejo. Para describir el transporte de forma analítica incluyendo la movilidad de los agentes

abarrotantes, se comparan las escalas de tiempo representativas del sistema que caracterizan el grado de movilidad. Las diferentes escalas de tiempo del sistema son: el tiempo característico de los agentes abarrotados (proteínas solubles) debido a su movilidad por difusión, el tiempo de relajación de la preproteína en transporte, y el tiempo de translocación.

Si la escala de tiempo de los agentes abarrotantes (definida por la lenta movilidad de las proteínas) es muy grande comparada con el tiempo de relajación de la cadena y el tiempo que tarda la proteína en ser translocada, entonces, se puede considerar a los agentes abarrotantes inmóviles durante la translocación de la proteína. Este caso, se conoce como el *régimen abarrotado estático* definido por Gopinathan y Kim [35].

En este régimen estático, si el tiempo de translocación es mucho mayor que el tiempo de relajación de la preproteína, entonces, la preproteína por carecer de plegamiento, accede a todas sus posibles conformaciones. Bajo estas consideraciones, la preproteína se comporta como una cadena ideal (o polímero sin interacciones) y el proceso de translocación es equivalente al transporte de una cadena ideal rodeada por agentes estáticos, el cual describimos a continuación.

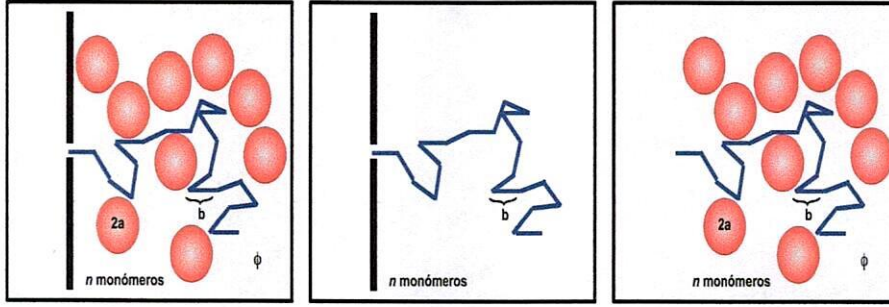
### 3.3.1. Energía libre para una cadena en un ambiente abarrotado estático

Tomando en cuenta que una preproteína en transporte en un régimen estático se comporta como una cadena ideal, vamos a indicar la forma de obtener la energía libre de la cadena como función del número de segmentos que atraviesan la membrana a través del poro o canal.

Durante el transporte, una cadena ideal de  $N$  monómeros está formada por dos segmentos, uno a cada lado de la membrana: lado *cis*, del cual parten los monómeros y lado *trans*, al cual llegan. El número de monómeros del segmento en el lado *trans* es  $n$  (el segmento de cadena que atraviesa), mientras que el número de monómeros del segmento en el lado *cis* es  $N - n$  (el segmento de cadena que aún no ha atravesado). Si las proteínas en los lados *cis* y *trans* ocupan fracciones de volumen respectivas  $\phi_{cis}$  y  $\phi_{trans}$ , entonces se reduce el volumen disponible para la cadena, y por lo tanto, los segmentos en ambos lados acceden a un número menor de conformaciones, comparado con el caso de una cadena en un sistema diluido. De esta forma, la energía libre de los segmentos, y por lo tanto, de la cadena, depende de la ocupación de las proteínas. Adicionalmente, cada segmento de la cadena por estar anclado al poro de la membrana, a la cual consideramos rígida e impenetrable, tiene un número menor de conformaciones comparado con las de un segmento en el espacio libre. Con estas dos consideraciones, la energía libre de una cadena o de un segmento debe tomar en cuenta la reducción en conformaciones por: 1) el anclaje al poro y la presencia de la pared, y 2) la presencia de los agentes abarrotantes.

Para la cadena en transporte de longitud  $N$ , la energía libre  $\mathcal{F}$  cuando  $n$  monómeros han atravesado, es la suma de la energía libre de los segmentos que se encuentran a cada lado de la membrana. Para cada segmento, podemos

separar la energía libre  $F_{\text{seg}}$  en dos partes, una que toma en cuenta la contribución estérica debido el anclaje de la cadena a la membrana y a la presencia de la membrana  $F_{\text{dil}}$ , y otra considerando la contribución estérica por la presencia de los agentes abarrotantes estáticos  $F_{\text{aba}}^{\text{est}}$ . En la Figura 3.4, se indican las contribuciones estéricas a la energía libre de un segmento.



**Figura 3.4:** Las conformaciones de un segmento de cadena de  $n$  monómeros (Figura de la izquierda) están restringidas por: 1) el anclaje de un extremo al poro de la pared (Figura del centro), y 2) por las conformaciones accesibles en presencia de los agentes estáticos (Figura de la derecha).

La primera contribución de  $F_{\text{seg}}$  corresponde a la energía libre de un segmento de  $n$  monómeros en un ambiente diluido, dada por  $F_{\text{dil}}(n)$ ; descrita en la Sección 3.2.1, y dada por la ecuación 3.19. La segunda contribución a la energía  $F_{\text{seg}}$  se calcula en el siguiente apartado para un segmento de  $n$  monómeros rodeado por agentes esféricos a una fracción de volumen  $\phi$ :  $F_{\text{aba}}^{\text{est}} = F(\phi, n)$ . Con estas dos contribuciones para cada segmento, la energía libre  $\mathcal{F}$  de la cadena de  $N$  monómeros cuando  $n$  han sido translocados es:

$$\mathcal{F}(\phi_{\text{cis}}, \phi_{\text{trans}}, N, n) = F(\phi_{\text{cis}}, N - n) + F(\phi_{\text{trans}}, n) + \frac{1}{2}k_{\text{B}}T \ln((N - n)n). \quad (3.21)$$

En la expresión anterior se ha considerado que la forma funcional  $F(\phi, n)$  es la misma para los segmentos de cadena alrededor de la membrana, ya que los medios alrededor de la membrana pueden diferir únicamente en la fracción de ocupación de agentes abarrotantes  $\phi$ . La dependencia en la ocupación de las proteínas a cada lado de la membrana depende de la dirección de transporte. Para el caso de traslocación, el lado *cis* corresponde al citoplasma, y el lado *trans* al lumen del RE; en retrotranslocación, los lados se invierten. En el lado derecho de la ecuación, los dos primeros términos corresponden a la contribución de cada segmento por abarrotamiento y el último término corresponde a la contribución debido a la presencia de la pared y al anclaje de los segmentos. De esta forma, para conocer la energía libre de la cadena, necesitamos la expresión  $F(\phi, n)$ , la cual discutimos a continuación.

### 3.3.2. Energía libre de un segmento rodeado por agentes esféricos estáticos

La presencia de agentes esféricos estáticos reduce el número de conformaciones permitidas a un segmento de cadena, comparado con las conformaciones del segmento en el espacio libre. La reducción en conformaciones, cambia la energía libre de forma entrópica. El cambio en la energía libre para un segmento de cadena de  $n$  monómeros es  $F = -ST = -k_B T \ln \Omega$  [26], donde  $S = k_B \ln \Omega(n)$  es la entropía dada en términos de  $\Omega(n)$ , que representa el número de conformaciones permitidas a la cadena de  $n$  monómeros debido a la presencia de los agentes estáticos. Si  $\Omega_0$  es el número total de trayectorias de una cadena en el espacio libre, entonces la probabilidad de las trayectorias permitidas es  $P_\Omega = \Omega/\Omega_0$ . Al despejar  $\Omega$  en términos de  $P_\Omega$ , se tiene:  $\Omega = \Omega_0 P_\Omega(n)$ . El número de conformaciones permitidas  $\Omega(n)$  equivale al número de trayectorias de un caminante browniano que ha sobrevivido al haber dado  $n$  pasos en un ambiente rodeado de trampas aleatorias de radio  $a$ , con una ocupación en volumen  $\phi$ . De esta forma,  $P_\Omega$  es igual a la probabilidad de que un caminante browniano sobreviva después de haber dado  $n$  pasos en el ambiente de trampas, esta probabilidad es llamada probabilidad de supervivencia  $P_s$ . En términos de  $P_s$ , la energía libre para un segmento es [35]:

$$F(\phi, n) = -k_B T \ln(P_s(\phi, n)). \quad (3.22)$$

En la expresión anterior, el término con  $\Omega_0$  es constante y no se ha escrito. La probabilidad de supervivencia  $P_s$ , se ha expresado como función del número de monómeros  $n$  de un segmento, sin embargo, en el modelo de un caminante browniano,  $P_s$  se expresa como función del tiempo.

La probabilidad de supervivencia como función del tiempo ha sido ampliamente estudiada [102, 27, 84, 85, 36], y se han distinguido dos comportamientos principales. En el primero, para tiempos cortos, la dependencia principal es una exponencial lineal y está dada por la solución de Smoluchowski:  $P_s(t) \sim \exp(-\kappa t)$  [102]. En el segundo, para tiempos grandes, la dependencia es una exponencial estirada, dada por la solución de Donsker–Varadhan:  $P_s(t) \sim \exp(-\lambda t^{3/5})$  [27]. En ambos regímenes, la dependencia de la probabilidad en el tamaño y en la fracción de volumen que ocupan las trampas se incluye en las constantes  $\kappa$  y  $\lambda$ . Para tiempos intermedios, entre los regímenes de Smoluchowski y el de Donsker–Varadhan, la forma analítica de  $P_s(t)$  no ha sido establecida, debido principalmente a la dificultad asociada a la resolución de la ecuación de difusión con condiciones a la frontera; sin embargo, el trabajo numérico de Barkema *et al.* [6] indica el comportamiento temporal asintótico que conecta dichos regímenes, el cual depende de la ocupación  $\phi$  de las trampas.

Al utilizar la forma analítica de la probabilidad de supervivencia en los límites de tiempos cortos y de tiempos largos, aplicada al caso de un segmento de cadena, se obtienen expresiones analíticas para la energía libre en los límites de segmentos cortos y segmentos largos. La expresión para cadenas cortas es más adecuada para modelar la translocación en un medio estático, debido a los

valores de abarrotamiento fisiológico  $\phi$  del citoplasma y del lumen del RE, de acuerdo a los resultados numéricos de Barkema [6], como se indica más abajo utilizando la longitud de entrecruzamiento  $N_c$ .

Antes de indicar la forma analítica para la energía libre, discutimos la forma de la probabilidad de supervivencia en los dos regímenes.

### Probabilidad de supervivencia para tiempos cortos

La probabilidad de supervivencia para tiempos cortos, se obtiene considerando un caminante browniano en una red o malla de nodos con trampas puntuales distribuidas aleatoriamente sobre los nodos, con probabilidad  $p$ . En dicho sistema, la probabilidad de que el caminante browniano no sea atrapado hasta el paso  $n$ , al realizar una caminata, es [120]:

$$F_n = (1 - p)^{R_n - 1} \quad (3.23)$$

asumiendo que el punto de partida no es una trampa. En la ecuación anterior  $R_n$  es el número de sitios diferentes visitados. La probabilidad de supervivencia se obtiene al promediar  $F_n$  sobre un ensamble de sistemas, y por lo tanto:

$$P_s(n) = \langle F_n \rangle = \langle (1 - p)^{R_n - 1} \rangle = \exp(\lambda) \langle \exp(-\lambda R_n) \rangle \quad (3.24)$$

con  $\lambda = -\ln(1 - p)$ . La expresión anterior ha sido escrita de tal forma que el promedio entre llaves corresponde a la definición de la función generadora de momentos  $C(\lambda)$  [87]:

$$C(\lambda) = \langle \exp(-\lambda R_n) \rangle = \int \exp(-\lambda R_n) P_{R_n} dn, \quad (3.25)$$

con  $P_{R_n}$  la función de probabilidad para  $R_n$  [87]. La expresión para la probabilidad de supervivencia en términos de la función generadora de momentos  $P_s(t) = \exp(\lambda)C(\lambda)$ , es útil si se conocen los momentos de  $R_n$ , ya que representan los términos principales del desarrollo en serie de la función generadora, dada como [87]:

$$C(\lambda) = 1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\lambda^n}{n!} M_n \quad (3.26)$$

donde los momentos de  $R_n$  están dados por  $M_m = \langle (R_n)^m \rangle$ . Utilizando la expresión anterior, se puede aproximar la función generadora de momentos con los primeros términos del desarrollo en serie, y por lo tanto, también la probabilidad de supervivencia [119].

En la expresión 3.24, se consideraron trampas puntuales. Para un caminante browniano rodeado por trampas de radio  $a$  distribuidas aleatoriamente en el espacio, la probabilidad de supervivencia es similar a 3.24, y toma la forma [85]:

$$\begin{aligned} P_s(n) &= \langle \exp[\ln(1 - c)N_b(n)] \rangle \\ P_s(n) &\approx \exp[\ln(1 - c)\langle N_b(n) \rangle] \end{aligned} \quad (3.27)$$

donde  $c$  es la densidad de trampas y reemplaza a la probabilidad  $p$  de la expresión 3.24 en el modelo de red de trampas puntuales. La densidad  $c$  representa el número de los sitios ocupados por las trampas en una red de volumen  $V$  y longitud  $b$ . La cantidad  $N_b(n)$  es el número de sitios diferentes visitados en una caminata de  $n$  pasos, y es la cantidad que debe calcularse. En este modelo, la longitud de red  $b$  también representa la longitud de paso de un caminante browniano; para obtener la descripción del sistema continuo se considera el límite cuando  $b \rightarrow 0$ .

El promedio del número de sitios visitados, como función del número de pasos  $n$ , está dado por [85]:

$$\langle N_b(n) \rangle = \Gamma n + \gamma n^{1/2} + \gamma_0 \quad (3.28)$$

con  $\Gamma = \frac{2\pi}{3b}$ ,  $\gamma = 8\sqrt{\frac{\pi}{6}} \left(\frac{a}{b}\right)^2$  y  $\gamma_0$  una constante independiente de  $n$ .

Para las trampas, su densidad en número  $c$  se obtiene como el número de trampas  $n_t$  entre el número de sitios de la red  $n_r$  de longitud  $b$ . La densidad  $c$ , en términos de la fracción de volumen que ocupan las trampas  $\phi$ , el volumen de la red  $V_{\text{red}} = n_r b^3$ , y el volumen por trampa  $v = \frac{4\pi a^3}{3}$ , se relaciona como:

$$\phi = \frac{n_t v}{V_{\text{red}}} = \frac{n_t v}{n_r b^3} = c \frac{v}{b^3} = c \left( \frac{4\pi a^3}{3b^3} \right). \quad (3.29)$$

Al sustituir  $\langle N_b(n) \rangle$  y  $c$ , la probabilidad de supervivencia en la ecuación 3.27 se escribe como función del tamaño de las trampas  $a$ , la fracción de volumen que ocupan  $\phi$  y la longitud de paso  $b$ :

$$P_s(n) \propto \exp \left( -\frac{b^2}{2a^2} \phi \left[ n + \sqrt{\frac{24n a^2}{\pi b^2}} \right] \right). \quad (3.30)$$

La expresión anterior se obtiene de la ecuación 3.27 al utilizar el desarrollo en serie a primer orden:  $\ln(1 - c) \approx -c$ , para  $c \ll 1$ . Para el caso de un segmento de cadena, las trampas representan los agentes abarrotantes de radio  $a$  con ocupación  $\phi$ , y  $b$  es la longitud de monómero del segmento.

### Probabilidad de supervivencia para tiempos largos

Para tiempos largos, la probabilidad de supervivencia en el régimen de Donsker–Varadhan está dada por [36]:

$$P_s(t) \propto \exp(-\nu_d n_s^{2/5} (Dt)^{3/5}) \quad (3.31)$$

donde  $\nu_d$  es una constante numérica que depende de la dimensión del espacio; para  $d = 3$  se tiene  $\nu_3 = \frac{5}{3} 4^{1/5} \pi^{8/5} \approx 13.73$ .  $n_s$  es el número promedio de trampas en una región; para trampas esféricas de radio  $a$  con fracción de ocupación  $\phi$ , se tiene  $n_s = \frac{\phi}{\frac{4}{3}\pi a^3}$ . En el factor  $Dt$ ,  $D$  es el coeficiente de difusión del caminante browniano, el cual tiene su análogo en el sistema de una cadena de  $n$  monómeros, al igualar el desplazamiento cuadrático medio del caminante

browniano  $\langle \bar{r}^2 \rangle$  con la distancia extremo a extremo  $\langle \bar{R}^2 \rangle$  de la cadena:  $Dt = \frac{b^2 n}{6}$ . Al sustituir  $\nu_3$ ,  $n_s$  y  $Dt$  en la ecuación 3.31, la probabilidad de supervivencia como función de  $n$ , aplicada a cadenas largas, es:

$$P_s(n) \propto \exp \left( -2.64 \left( \frac{b}{a} \right)^{6/5} \phi^{2/5} n^{3/5} \right). \quad (3.32)$$

### Longitud de entrecruzamiento $N_c$ y el régimen estático para cadenas cortas

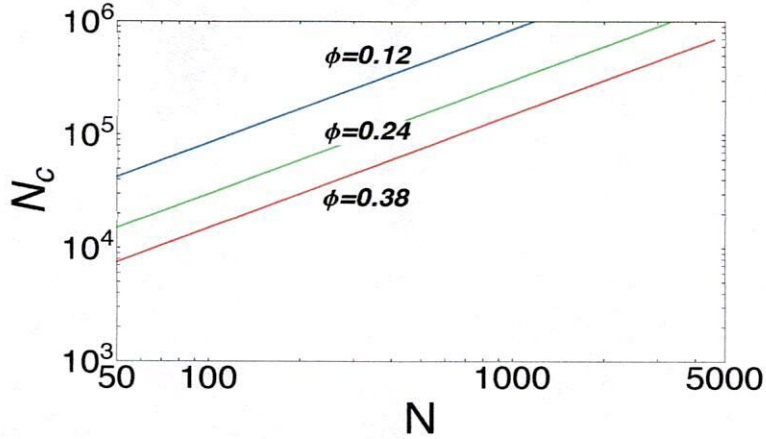
La energía libre de un segmento puede calcularse por medio de la ecuación 3.22 utilizando las expresiones para la probabilidad de supervivencia para cadenas cortas (ecuación 3.30) y para cadenas largas (ecuación 3.32). Ambas expresiones son válidas para valores de  $n$  lejanos a la longitud de entrecruzamiento  $N_c$ , valor en el cual la descripción para cadenas cortas y cadenas largas es similar pero no se conoce la forma analítica por no conocer la probabilidad de supervivencia. El valor de  $N_c$  ha sido estimado para sistemas en dos y tres dimensiones por medio del método de Monte Carlo para polímeros [6], y ha resultado dependiente de la densidad de ocupación en número de los agentes abarrotantes  $c$ . En tres dimensiones, el entrecruzamiento ocurre cuando [6]:

$$N_c = \left( \frac{8.5}{-\ln(1-c)} \right)^{3/2} \quad (3.33)$$

por lo tanto, cualquier cadena con un número de monómeros  $n$  mucho menor que  $N_c$  ( $n \ll N_c$ ) estará en el régimen de cadenas cortas, y cualquier cadena en la cual  $n \gg N_c$  estará en el régimen de cadenas largas. La longitud de entrecruzamiento, utilizando el desarrollo en serie a primer orden para el logaritmo ( $c \ll 1$ ) y sustituyendo la densidad  $c$  con la fracción de ocupación  $\phi$  de los agentes esféricos de radio  $a$  por medio de la ecuación 3.29, es:

$$N_c = 212 \left( \frac{a}{b} \right)^2 \phi^{-3/2}. \quad (3.34)$$

Al considerar que las cadenas en translocación son de la misma especie que las proteínas que abarrotan, con tamaño igual al radio de giro ( $a = b\sqrt{N/6}$ ), entonces la longitud de entrecruzamiento se vuelve función del tamaño de la cadena  $N$ . En la Figura 3.5, se muestra la longitud de entrecruzamiento para diferentes fracciones de ocupación  $\phi$  dentro de los valores de abarrotamiento fisiológico. Se observa que al aumentar la fracción de ocupación  $\phi$  la longitud de entrecruzamiento disminuye. Adicionalmente,  $N_c$  crece al aumentar el tamaño de la cadena, debido a la dependencia en  $N$  para el radio de giro. Para los valores fisiológicos más grandes de  $\phi$ , donde la longitud de entrecruzamiento es menor, la longitud de entrecruzamiento es mayor que cualquier valor de  $N$  en el intervalo de valores fisiológicos (desde 70 hasta  $\approx 4500$ ). El menor valor de entrecruzamiento  $N_c$  es  $\approx 7000$  (ver lado izquierdo de la Figura 3.5) es mayor a cualquier tamaño de proteína de interés biológico, y por lo tanto, el modelo de agentes abarrotantes estáticos está dentro del régimen de cadenas cortas.



**Figura 3.5:** Longitud de entrecruzado  $N_c$  como función del tamaño de la cadena en transporte  $N$ . Las líneas corresponden a tres diferentes fracciones de ocupación  $\phi$  dentro de los valores fisiológicos de abarrotamiento por proteínas.

#### Energía libre de un segmento en el régimen de cadenas cortas

Debido a los valores fisiológicos de abarrotamiento, la probabilidad de supervivencia por abarrotamiento estático corresponde a la del régimen de cadenas cortas dada por la expresión 3.30. De esta forma, la energía libre de un segmento por abarrotamiento estático, al utilizar la ecuación 3.22, está dada por:

$$\frac{F(\phi, n)}{k_B T} = \frac{1}{2} \left(\frac{b}{a}\right)^2 \phi \left( n + \sqrt{\frac{24a^2}{\pi b^2} n} \right). \quad (3.35)$$

La energía libre para una cadena de  $N$  monómeros, en transporte, se obtiene sustituyendo la expresión anterior en la ecuación 3.21.

### 3.4. Modelo de transporte para una cadena en un ambiente abarrotado por agentes esféricos móviles: el modelo abarrotado dinámico

Durante el transporte (translocación o retrotranslocación) una cadena de  $N$  monómeros está sujeta a la interacción de las proteínas que abarrotan el citoplasma y el lumen del RE. Tomando en cuenta únicamente la parte conformacional, debido al grado de abarrotamiento fisiológico y las escalas de tiempo características de transporte y de relajación de la cadena, se muestra en el capítulo 5 que el transporte ocurre en un ambiente abarrotado por proteínas de gran movilidad, definido como el régimen dinámico de Gopinathan y Kim [35]. A continuación

discutimos las características principales del modelo, y las expresiones para la energía libre de una cadena en transporte en un régimen dinámico.

### 3.4.1. Energía libre para una cadena en un régimen dinámico

Una cadena de  $N$  monómeros en transporte tiene  $n$  monómeros en el lado *trans* y el resto  $N - n$  en el lado *cis*. En un régimen dinámico, la interacción de un segmento de cadena con los agentes abarrotantes en movimiento promueve que los monómeros del segmento de cadena se confinen en una región globular [55, 105], fenómeno que permite aumentar el número de conformaciones de la cadena (un segmento de cadena en una conformación alargada rodeada de agentes tiene más restricciones en sus conformaciones comparando con el caso de un segmento confinado) y la entropía de las agentes abarrotantes. Para una cadena en transporte, la energía libre  $\mathcal{F}$  es la suma de la energía libre del segmento que entra al lado *trans*,  $F(\phi_{\text{trans}}, n)$ , y la energía libre del segmento que está en el lado *cis*,  $F(\phi_{\text{cis}}, N - n)$ , ambos segmentos confinados en una región globular debido al abarrotamiento dinámico. En el régimen dinámico, la energía libre  $\mathcal{F}$  de la cadena en transporte es:

$$\mathcal{F}(\phi_{\text{cis}}, \phi_{\text{trans}}, N, n) = F(\phi_{\text{cis}}, N - n) + F(\phi_{\text{trans}}, n). \quad (3.36)$$

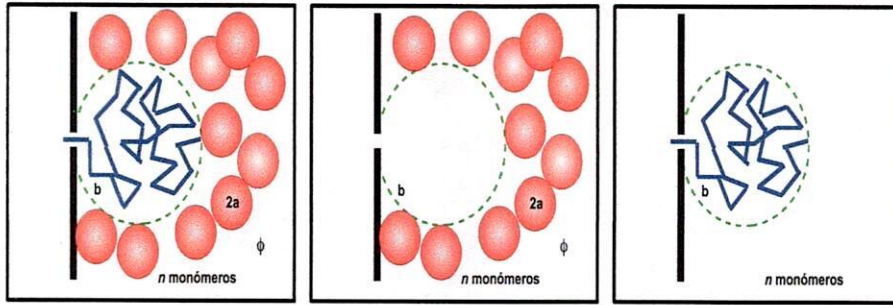
En la expresión anterior, se ha considerado la misma expresión para la energía libre  $F$  en ambos lados de la membrana, asumiendo que la única diferencia entre los medios rodeando la pared es la fracción de ocupación  $\phi$ . A diferencia de la energía libre en el régimen estático (ecuación 3.21), en la expresión anterior no aparece la energía libre de una cadena en transporte en un ambiente diluido, ya que en el régimen dinámico el colapso de la cadena permite considerar a la cadena formada por dos segmentos colapsados en globulos.

### 3.4.2. Energía libre de un segmento de cadena en un régimen dinámico

En la expresión para la energía libre de la cadena, ecuación 3.36, aparece la energía libre de un segmento de cadena:  $F$ . La energía libre de un segmento tiene dos contribuciones, una asociada al trabajo necesario para generar una cavidad esférica en un ambiente de proteínas esféricas,  $F_{\text{cav}}$ , y otra asociada a las conformaciones posibles del segmento colapsado en la región globular,  $F_{\text{entrop}}$ . En la Figura 3.6, se ilustra la descomposición de ambas contribuciones.

#### Energía libre de un segmento debido a la formación de una cavidad esférica

La energía libre debido a la formación de una cavidad de radio  $r$  en un ambiente de esferas de radio  $a$ , con una fracción de volumen  $\phi$ , equivale al trabajo necesario  $W$  para formar una cavidad de radio  $r$ . El trabajo  $W$  se conoce



**Figura 3.6:** Un segmento colapsado por abarrotamiento dinámico (Figura de la izquierda) presenta dos contribuciones a la energía libre, una asociada a la creación de una cavidad esférica en un mar de esferas (Figura del centro), y otra asociada a las conformaciones del segmento en la región globular (Figura de la derecha).

en dos casos, cuando  $r < a$ , denotado  $W_0$ , y cuando  $r \gg a$ , denotado  $W_{\text{macro}}$ ; para valores intermedios de  $r$  existen aproximaciones del trabajo tomando como expresiones de partida  $W_0$  y  $W_{\text{macro}}$ . Primero indicamos las expresiones  $W_0$  y  $W_{\text{macro}}$ , después las expresiones aproximadas de  $W$  para valores intermedios de  $r$ , y por último la expresión asociada a la energía libre.

Para cavidades de radio  $r < a$ , el trabajo  $W_0$  depende de la fracción de volumen libre de esferas  $(1 - \frac{4\pi r^3}{3}c_p)$ , y está dado como [16, 82, 83]:

$$W_0 = -k_B T \ln \left( 1 - \frac{4\pi r^3}{3}c_p \right) \text{ para } r < a, \quad (3.37)$$

en donde  $c_p$  representa la densidad en número de las esferas, la cual se puede escribir en función de la fracción de volumen  $\phi$  que ocupan las esferas de radio  $a$  mediante  $\phi = c_p \frac{4\pi a^3}{3}$ . En la expresión anterior, se considera que el tamaño de la cavidad es suficientemente pequeño de tal forma que no se pueda encontrar una partícula esférica de tamaño  $a$ , por lo tanto, el trabajo está relacionado con la probabilidad de que exista un hueco de tamaño  $r < a$  en un sistema formado por esferas de radio  $a$  [82].

Para una cavidad de tamaño macroscópico ( $r \gg a$ ), el trabajo necesario  $W_{\text{macro}}$  depende de la presión  $p$  que ejerce el sistema de esferas y de la fuerza asociada a la tensión superficial  $\sigma$ . La expresión para el trabajo es [16]:

$$W_{\text{macro}} = pV + \sigma \left( 1 - \frac{2\delta}{r} \right) S \quad (3.38)$$

donde  $V$  y  $S$  son el volumen y el área superficial de la cavidad, respectivamente; además,  $\delta$  representa la longitud de Tolman<sup>1</sup> asociada a la curvatura de

<sup>1</sup>La longitud de Tolman  $\delta$  se utiliza para incluir el efecto de la curvatura sobre la tensión superficial  $\sigma$  de una gota. Esta cantidad mide el grado al cual la tensión superficial de una gota pequeña se desvía del valor de la tensión superficial  $\sigma$  de una superficie plana [8].

la cavidad [100]. Para una cavidad esférica, el volumen y el área superficial son  $V = \frac{4\pi r^3}{3}$  y  $S = 4\pi r^2$ .

Para cavidades de tamaño  $r > a$ , existen expresiones aproximadas del trabajo  $W(r)$ , para  $r \sim a$  y para  $r \gg a$ .

Para cavidades de tamaño  $r \sim a$ , una forma aproximada del trabajo  $W$  se obtiene del desarrollo en serie de Taylor a tercer orden, alrededor de  $r = a$  [77]. La expresión aproximada es  $W(r) = W_0(a) + W_0'(r-a) + \frac{1}{2}W_0''(r-a)^2 + \frac{1}{6}W_0'''(r-a)^3$ , y en ella se utiliza la continuidad de las primeras derivadas en  $r = a$ . En esta versión aproximada el término constante resulta importante para cavidades de tamaño  $r \approx a$  [77].

Para cavidades de tamaño  $r \gg a$ , la expresión para el trabajo  $W$  debe parecerse a la expresión del trabajo para cavidades macroscópicas  $W_{\text{macro}}$ , en la cual solo aparecen términos dependientes de  $r$ . Una forma para obtener la expresión aproximada para el trabajo consiste en tomar la expresión del trabajo macroscópico  $W_{\text{macro}}$  (ecuación 3.38) utilizando como constantes a determinar  $p$ ,  $\sigma$  y  $\delta$ . Las tres constantes se obtienen pidiendo: a) continuidad en las dos primeras derivadas del trabajo en  $r = a$ , al igualar  $W_0$  con  $W_{\text{macro}}$ , y b) utilizando la forma exacta de la presión<sup>2</sup> en términos de la función de correlación por pares  $g(r)$ , dada como [82, 16]:

$$\frac{p}{k_{\text{B}}T} = c_{\text{p}} + \frac{2}{3}\pi d^3 c_{\text{p}}^2 g(d) \quad (3.39)$$

en donde la función de correlación  $g$  se expresa en términos del trabajo necesario para formar la cavidad,  $g(d) = \frac{W'(d)}{4\pi d^2 c_{\text{p}} k_{\text{B}}T}$  [83, 16], con  $W = W_{\text{macro}}$ , y  $d = 2a$  el diámetro de una esfera.

Del trabajo macroscópico,  $W_{\text{macro}}$ , sustituyendo el volumen y el área superficial de una esfera, y separando los términos en potencias de  $r$ , se obtiene una expresión que equivale al desarrollo en serie de Taylor, a tercer orden, para el trabajo necesario para generar una cavidad de tamaño arbitrario  $W(r)$ :

$$W(r) = (-8\pi\delta\sigma)r + (4\pi\sigma)r^2 + \left(\frac{4}{3}\pi p\right)r^3. \quad (3.40)$$

En la expresión anterior, aparecen las constantes a determinar  $\delta$ ,  $\sigma$  y  $p$ . Al resolver el sistema de tres ecuaciones, dado por la continuidad en las dos primeras derivadas del trabajo en  $r = a$ :

$$\frac{dW_{\text{macro}}}{dr}\Big|_{r=a} = \frac{dW_0}{dr}\Big|_{r=a} \quad (3.41)$$

$$\frac{d^2W_{\text{macro}}}{dr^2}\Big|_{r=a} = \frac{d^2W_0}{dr^2}\Big|_{r=a} \quad (3.42)$$

$$(3.43)$$

---

<sup>2</sup>Para conocer la presión es suficiente con conocer la función de correlación por pares cuando dos esferas están en contacto, esto es, cuando sus centros están separados por una distancia  $d = 2a$  [83].

y la forma exacta de la presión, la expresión 3.39, se obtiene:

$$\delta = a \frac{\phi}{1 + \phi}, \quad (3.44)$$

$$\sigma = -\frac{9k_{\text{B}}T}{8\pi a^2} \frac{\phi^2(1 + \phi)}{(1 - \phi)^3}, \quad (3.45)$$

$$p = \frac{3k_{\text{B}}T}{4\pi a^3} \frac{\phi(1 + \phi + \phi^2)}{(1 - \phi)^3}. \quad (3.46)$$

En las expresiones anteriores aparece la dependencia en  $\phi$ , la cual se obtuvo al reemplazar  $c_{\text{p}} = \phi/\frac{4\pi a^3}{3}$ . Al sustituir las tres constantes en el trabajo  $W(r)$  (ecuación 3.40), y al ordenar términos se obtiene:

$$\frac{W(r)}{k_{\text{B}}T} = \frac{\phi(1 + \phi + \phi^2)}{(1 - \phi)^3} \left(\frac{r^3}{a^3}\right) - \frac{9}{2} \frac{\phi^2(1 + \phi)}{(1 - \phi)^3} \left(\frac{r^2}{a^2}\right) + 9 \frac{\phi^3}{(1 - \phi)^3} \left(\frac{r}{a}\right). \quad (3.47)$$

Esta expresión aproximada para el trabajo  $W(r)$ , comparada con la expresión  $W_0(r)$  para  $r = a$ , difiere en no más del 10 % para valores de  $\phi \approx 0$ , para valores de  $\phi > 0.3$  la diferencia crece con  $\phi$  en más del 10 %. En nuestro trabajo de investigación utilizamos la expresión aproximada  $W(r)$ , ecuación 3.47, por ser una expresión más general en cuanto al tamaño de la cavidad.

La energía libre asociada a la creación de la cavidad,  $F_{\text{cav}}$ , es el trabajo necesario para generar la cavidad esférica,  $W(r)$ . Al considerar que en la cavidad de radio  $r$ , un segmento de cadena de longitud  $n$  se comporta como un gas de  $n$  monómeros con volumen  $nb^3$ , entonces el radio se escribe como función del número de monómeros y de la longitud de monómero:  $r = \left(\frac{3n}{4\pi}\right)^{1/3} b$ . Sustituyendo  $r$  en el trabajo  $W(r)$  (ecuación 3.47), la energía libre para la creación de la cavidad es:

$$\frac{F_{\text{cav}}(\phi, n)}{k_{\text{B}}T} = \frac{\phi(1 + \phi + \phi^2)}{(1 - \phi)^3} \left(\frac{n}{v}\right) - \frac{9}{2} \frac{\phi^2(1 + \phi)}{(1 - \phi)^3} \left(\frac{n}{v}\right)^{2/3} + 9 \frac{\phi^3}{(1 - \phi)^3} \left(\frac{n}{v}\right)^{1/3}. \quad (3.48)$$

En la expresión anterior, se ha introducido  $v = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{a}{b}\right)^3$ , que representa el volumen de un agente abarrotante en unidades de la longitud de Kuhn  $b$ .

### Energía libre conformacional de un segmento en una cavidad esférica

Un segmento de cadena de  $n$  monómeros dentro de una cavidad esférica de radio  $r \sim n^{1/3}b$ , tiene restringido el número de conformaciones accesibles. La fracción de las conformaciones permitidas para la cadena debido al confinamiento en una cavidad esférica de radio  $r$  es  $f = 6/\pi^2 \sum_{i=1}^{\infty} 1/k^2 \exp(-(\pi k R_{\text{g}}/r)^2)$  [114]. La energía libre por la restricción en las conformaciones para un segmento de  $n$  monómeros es  $F_{\text{entrop}}(n) = -k_{\text{B}}T \ln f$  [114]. Tomando el término de la serie que más contribuye, con  $k = 1$ , la energía  $F_{\text{entrop}}$ , va como  $\pi^2 R_{\text{g}}^2/r^2$  [35]. Con

el radio de giro para una cadena ideal  $R_g$ , dado por la ecuación 3.5, y con  $r$  en términos de  $n$  y  $b$  para una cavidad esférica, la energía libre  $F_{\text{entrop}}$  es [35]:

$$\frac{F_{\text{entrop}}}{k_B T} = \frac{\pi^2}{6} n^{1/3}. \quad (3.49)$$

En la expresión anterior se ha excluido el término independiente de  $n$ .

### Energía libre de un segmento de cadena y de una cadena en un régimen dinámico

Para un segmento de cadena de longitud  $n$ , la energía libre debido a la formación de la cavidad y a las conformaciones posibles,  $F$ , está dada por la suma de la energía libre  $F_{\text{cav}}$  (ecuación 3.48) y la energía libre  $F_{\text{entrop}}$  (ecuación 3.49):

$$F(\phi, n) = F_{\text{cav}}(\phi, n) + F_{\text{entrop}}(\phi, n) \quad (3.50)$$

o

$$\frac{F(\phi, n)}{k_B T} = \frac{\phi(1 + \phi + \phi^2)}{(1 - \phi)^3} \left(\frac{n}{v}\right) - \frac{9\phi^2(1 + \phi)}{2(1 - \phi)^3} \left(\frac{n}{v}\right)^{2/3} + 9\frac{\phi^3}{(1 - \phi)^3} \left(\frac{n}{v}\right)^{1/3} + \frac{\pi^2}{6} n^{1/3}. \quad (3.51)$$

Para una cadena de longitud  $N$ , la energía libre durante el transporte en un régimen dinámico,  $\mathcal{F}$ , se calcula considerando los dos segmentos de cadena en el lado *cis* y en el lado *trans*, con las fracciones de volumen de los agentes abarrotantes  $\phi_{\text{cis}}$  y  $\phi_{\text{trans}}$  correspondientes, como se indica en la ecuación 3.36.

## Capítulo 4

# Metodología: Tiempo promedio de primer paso

La velocidad promedio de translocación, dada en aminoácidos por segundo, es una cantidad que ha sido medida experimentalmente en diferentes sistemas diluidos que utilizan vesículas de la membrana inversa o proteoliposomas [31, 101, 51]. A partir de los valores experimentales de la velocidad de translocación  $v$  y del número de aminoácidos de la cadena  $N$ , se ha calculado de forma indirecta el tiempo promedio de translocación  $\tau_{\text{exp}}$ , como  $N/v$ . En este capítulo, introducimos una cantidad equivalente al tiempo de translocación, llamada tiempo promedio de primer paso o tiempo promedio de primer arribo  $\tau$ , la cual es calculada en el capítulo 6 y es utilizada para comparar con los valores experimentales  $\tau_{\text{exp}}$ .

Iniciamos el capítulo con la metodología relacionada al tiempo promedio de primer paso, finalizando con la ecuación que permite su cálculo analítico para sistemas diluidos y su cálculo numérico para sistemas abarrotados.

### 4.1. Función de distribución

Durante la translocación o retrotranslocación, una cadena se encuentra bajo la influencia de diversas fuerzas, por ejemplo, la fuerza entre aminoácidos cargados y las cargas del medio circundante [113], la interacción debida al volumen excluido por la presencia de moléculas y de la membrana [45], y fuerzas de origen browniano por la colisión entre las especies del medio intracelular con la cadena.

Debido a la irregularidad geométrica de la cadena y del sistema de transporte, y al tipo de interacciones sobre la cadena, el número de aminoácidos  $n$  que han atravesado la membrana a un tiempo  $t$  resulta una cantidad estocástica, por lo tanto, la descripción del proceso de transporte se realiza de forma estadística mediante cantidades promedio.

Sea  $P(n, t)$  la densidad de probabilidad de que  $n$  monómeros han atravesado

la membrana en el intervalo de tiempo de  $t$  a  $t + dt$ . Si sobre la cadena se consideran las interacciones estéricas por la presencia de la membrana o de los agentes abarrotantes, mediante el potencial  $U$ , la función de distribución  $P$  se puede obtener al resolver la ecuación diferencial [106, 96, 35]:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{1}{b^2} \frac{\partial}{\partial n} \left( D \frac{\partial \beta U}{\partial n} P \right) + \frac{1}{b^2} \frac{\partial}{\partial n} \left( D \frac{\partial P}{\partial n} \right). \quad (4.1)$$

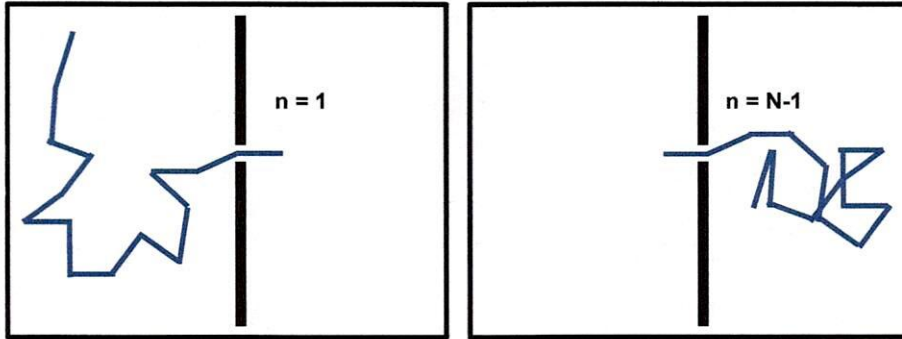
En dicha ecuación, los términos del lado derecho generan el cambio en la densidad de probabilidad. El primero es llamado término de arrastre, y se debe a la presencia del potencial  $U$ , y el segundo término se llama arrastre difusivo, debido a la naturaliza estocástica del medio [19]. La expresión anterior, llamada ecuación de difusión, se utiliza cuando existen condiciones inhomogéneas en la variable estocástica, y el proceso se realiza a temperatura constante [106]. En la ecuación anterior, aparece la longitud de monómero  $b$ , y  $\beta = \frac{1}{k_B T}$ .

Para obtener la función de probabilidad  $P$ , se debe resolver la ecuación de difusión, ecuación 4.1, con las condiciones iniciales y de frontera correspondientes. Al conocer  $P$ , todas las cantidades promedio relacionadas con el número de monómeros translocados  $n$  se obtienen por integración. Sin embargo, debido a la complejidad para resolver la ecuación diferencial para  $P$  (soluble de forma analítica solo para casos simples), en lugar de calcular  $P$ , se resuelve otra ecuación diferencial que es más fácil de resolver y que no requiere el conocimiento previo de  $P$ . Dicha solución permite el cálculo del tiempo de transporte de forma analítica o numérica.

## 4.2. Tiempo promedio de primer paso

Para describir el proceso de transporte se ha utilizado al número de monómeros translocados  $n$ , como función del tiempo  $t$ . Para una cadena de longitud  $N$ , una realización del transporte, translocación o retrotranslocación, consiste en el proceso de alcanzar el estado en el cual  $n = N - 1$  monómeros han atravesado la membrana partiendo del estado en que un solo monómero ( $n = 1$ ) ha atravesado (ver Figura 4.1). En este proceso, no se ha considerado el arribo e inserción de la cadena al canal o su liberación del canal después de atravesarlo. Para una cadena, el tiempo que tarda una realización, y que corresponde al tiempo de transporte, es diferente entre diferentes realizaciones. Por lo tanto, el tiempo de transporte es una cantidad estocástica, y para caracterizarlo se utiliza el tiempo promedio que se obtiene al considerar todas las posibles realizaciones.

El tiempo promedio de transporte corresponde al tiempo promedio de primer paso o tiempo promedio de primer arribo  $\tau$ , definido como el tiempo en el cual una variable aleatoria toma por primera vez valores fuera de un intervalo [87]. En el caso de translocación, corresponde al tiempo cuando  $n$  alcanza por primera vez el valor  $N - 1$ , partiendo del valor inicial  $n = 1$ , en donde, adicionalmente, se toma  $n = 1$  como una condición de frontera reflejante, para excluir los casos cuando la cadena se regresa. El tiempo promedio de transporte  $\tau$  es



**Figura 4.1:** El tiempo de transporte para una cadena, es el tiempo necesario para pasar de un estado en el cual solo un monómero ha atravesado ( $n = 1$ , Figura izquierda) hasta un estado en el cual falta un monómero por atravesar ( $n = N - 1$ , Figura derecha). En el modelo no se considera el arribo e inserción de la cadena al canal, y tampoco, la salida del canal del último monómero.

utilizado como tiempo de translocación o retrotranslocación para los modelos de transporte utilizados en este trabajo.

Para calcular el tiempo promedio de primer paso, consideramos la densidad de probabilidad  $\omega(N, t | n_0, 0)$  de que  $N - 1$  monómeros han atravesado al tiempo  $t$  con la condición de que  $n_0$  monómeros habían atravesado al tiempo  $t = 0$  s. La integral de  $\omega$  sobre un intervalo de tiempo da la probabilidad de que  $N - 1$  atravesen en ese intervalo de tiempo. El tiempo promedio de primer paso se obtiene integrando  $t$  con la densidad de probabilidad  $\omega$ , como:

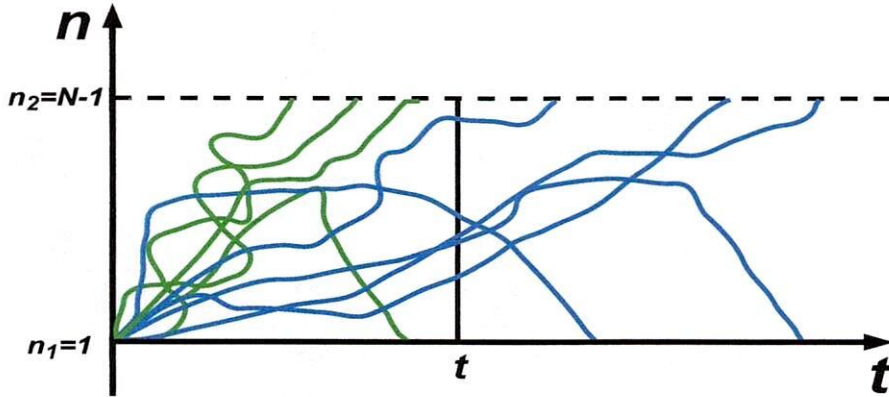
$$\tau(N, n_0) = \int_0^{\infty} t \omega(N, t | n_0, 0) dt. \quad (4.2)$$

Para conocer la densidad de probabilidad  $\omega$ , se utiliza la función de probabilidad  $P$  de la forma siguiente.  $P(n, t | n_0, 0)$  es la densidad de probabilidad condicional de que  $n$  monómeros han atravesado la membrana al tiempo  $t$ , con la condición de que  $n_0$  monómeros han atravesado en  $t = 0$  s. La probabilidad  $q(n_0, t)$  de todas las realizaciones que han iniciado en  $n_0$  y que al tiempo  $t$  no han alcanzado alguno de los valores  $n_1 = 1$  o  $n_2 = N - 1$ , se obtiene integrando  $P$  en la variable  $n$ , desde  $n_1$  hasta  $n_2$  [87]:

$$q(n_0, t) = \int_{n_1}^{n_2} P(n, t | n_0, 0) dn. \quad (4.3)$$

La probabilidad  $q$  se obtiene también de  $\omega$  mediante la definición. La probabilidad de que al tiempo  $t$  se han alcanzado los valores  $n_1 = 1$  o  $n_2 = N - 1$  es  $\int_0^t \omega(N, t | n_0, 0) dt$ . La probabilidad  $q$  de que no se hayan alcanzado los valores  $n_1 = 1$  o  $n_2 = N - 1$  es la probabilidad complementaria (ver Figura 4.2):

$$q(n_0, t) = \int_t^{\infty} \omega(N, t | n_0, 0) dt. \quad (4.4)$$



**Figura 4.2:** Las realizaciones que al tiempo  $t$  no han alcanzado el valor  $n_1 = 1$  o  $n_2 = N - 1$  se han indicado en color azul claro. Las realizaciones que han alcanzado los valores  $n_1 = 1$  o  $n_2 = N - 1$  al tiempo  $t$  se indican en color verde.

Las dos expresiones anteriores son útiles para construir la ecuación diferencial para el tiempo promedio de primer paso. De la expresión anterior (ecuación 4.4) al derivar en el tiempo se obtiene:

$$\frac{\partial q(n_0, t)}{\partial t} = -\omega(N, t | n_0, 0). \quad (4.5)$$

Considerando al tiempo  $t$  como el tiempo de primer paso  $T$  (el tiempo cuando por primera vez se alcanza el valor  $n_2 = N - 1$ ), la densidad de probabilidad para el tiempo de primer paso queda como:

$$\omega(N, T | n_0, 0) = -\frac{\partial q(n_0, T)}{\partial T}. \quad (4.6)$$

De la ecuación anterior, al sustituir en  $q$  la ecuación 4.3 con  $t = T$ , se obtiene  $\omega$  en términos de la densidad de probabilidad  $P$ , como:

$$\omega(N, T | n_0, 0) = -\int_{n_1}^{n_2} \frac{\partial P(n, T | n_0, 0)}{\partial T} dn. \quad (4.7)$$

Al conocer  $\omega$ , el tiempo promedio de primer paso  $\tau = \langle T \rangle$  se calcula mediante el primer momento del tiempo de primer paso  $T$ :

$$\tau = \langle T \rangle = \int_0^{\infty} T \omega(N, T | n_0, 0) dT. \quad (4.8)$$

La última expresión para el tiempo promedio de primer paso está dada en términos de la densidad de probabilidad  $\omega$ , y está dada en términos de la densidad de probabilidad  $P$  (ecuación 4.7). En la siguiente sección, indicamos otro método para calcular  $\langle T \rangle$ , sin la necesidad de obtener  $P$ .

### 4.3. La ecuación diferencial para el tiempo promedio de primer paso

Un método para calcular el tiempo promedio de primer paso es mediante la densidad de probabilidad  $\omega$  (ecuación 4.8), la cual requiere el conocimiento previo de la función de probabilidad  $P$  (ecuación 4.7). Por dicho método, es necesario encontrar la probabilidad  $P$ , al resolver la ecuación diferencial 4.1.

Otra forma para calcular  $\langle T \rangle$ , evitando el cálculo de  $P$ , es por medio de la solución de la ecuación diferencial para el tiempo promedio de primer paso, que se obtiene partiendo de la ecuación de difusión 4.1. Esta ecuación, escrita por medio del operador diferencial de Fokker-Planck  $\mathcal{L}_{FP}(n)$ , toma la forma [96]:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \mathcal{L}_{FP}(n) P \quad (4.9)$$

donde  $\mathcal{L}_{FP}(n) = (1/b^2) (\partial/\partial n) D(n) \exp(-\beta U(n)) (\partial/\partial n) \exp(\beta U(n))$ . La ecuación anterior tiene su equivalente en términos del operador adjunto, dado como  $\mathcal{L}_{FP}^\dagger(n_0) = (1/b^2) \exp(\beta U(n_0)) (\partial/\partial n_0) D(n_0) \exp(-\beta U(n_0)) (\partial/\partial n_0)$ , en donde la variable es  $n_0$  en lugar de  $n$ . El operador adjunto, aplicado a  $P$ , da origen a una ecuación diferencial similar a la ecuación 4.9, [87]:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = -\mathcal{L}_{FP}^\dagger(n_0) P. \quad (4.10)$$

Esta última expresión es vital para construir la ecuación diferencial para el tiempo promedio de primer paso, como se indica a continuación.

Partiendo de la definición para el tiempo promedio de primer paso, ecuación 4.8, primero se sustituye la densidad  $\omega$  en términos de  $P$ , ecuación 4.7, después se intercambia el orden de integración. Al integrar por partes en  $T$ , el término  $TP|_{T=\infty}^{T=0}$  se anula considerando que  $\lim_{T \rightarrow \infty} P = 0$  domina a  $T$ , y se obtiene:

$$\begin{aligned} \tau = \langle T \rangle &= - \int_{n_1}^{n_2} \int_0^\infty T \frac{\partial P(n, T | n_0, 0)}{\partial T} dT dn \\ &= \int_{n_1}^{n_2} \int_0^\infty P(n, T | n_0, 0) dT dn. \end{aligned} \quad (4.11)$$

En la ecuación resultante, el lado izquierdo sólo depende de la condición inicial  $n_0$  y el único integrando es la función de probabilidad  $P$ , la cual, por ser condicional al valor  $n_0$  en  $t = 0$  s, satisface  $P(n, T | n_0, 0) = P(n, 0 | n_0, -T)$  [87]. Sustituyendo la relación anterior, y aplicando el operador de Fokker-Planck adjunto a ambos lados de la ecuación 4.11, se obtiene:

$$\mathcal{L}_{FP}^\dagger(n_0) \tau = \mathcal{L}_{FP}^\dagger(n_0) \int_{n_1}^{n_2} \int_0^\infty P(n, 0 | n_0, -T) dT dn. \quad (4.12)$$

En el lado derecho de la ecuación, al introducir el operador adjunto en la segunda integral, y utilizando el lado izquierdo de la ecuación diferencial 4.10, se obtiene, al integrar en el tiempo  $T$ :

$$\mathcal{L}_{FP}^\dagger(n_0)\tau = \int_{n_1}^{n_2} -\delta(n - n_0) dn \quad (4.13)$$

donde  $\delta$  es la función delta de Dirac. Finalmente, al integrar en  $n$ , tomando en cuenta que  $n_0$  está dentro del intervalo ( $n_1 = 1, n_2 = N - 1$ ), se obtiene la ecuación diferencial para el tiempo promedio de primer paso  $\tau$  [87, 96]:

$$\mathcal{L}_{FP}^\dagger(n_0)\tau = -1. \quad (4.14)$$

#### 4.4. Solución de la ecuación diferencial para el tiempo promedio de primer paso

Para conocer el tiempo promedio de primer paso  $\tau$ , mediante la solución de la ecuación diferencial 4.14, se utilizan las condiciones de frontera reflejantes en  $n_1 = 1$  y absorbentes en  $n = N - 1$ , con las cuales, descartamos el caso en el cual la cadena regresa al lado de partida.

Debido a la forma de la ecuación diferencial 4.14 y a la forma del operador adjunto, la ecuación diferencial se resuelve mediante integración directa. Para resolver, primero se despejan los términos fuera del operador de derivadas que se encuentran del lado izquierdo y se integra desde  $n$  hasta el primer valor frontera  $n_1$ :

$$D \exp(-\beta U) (\partial/\partial n_0)\tau = - \int_n^{n_1} b^2 \exp(-\beta U) dn_0 \quad (4.15)$$

volviendo a despejar los términos fuera de la derivada e integrando por segunda vez, desde  $n_1$  hasta  $n_2$ , se obtiene:

$$\tau = - \int_{n_1}^{n_2} \frac{1}{D} \exp(\beta U) \int_n^{n_1} b^2 \exp(-\beta U) dn_0 dn. \quad (4.16)$$

La ecuación anterior se obtiene de la variable estocástica  $n$ , la cual está sujeta al potencial estérico de la cadena  $\mathcal{F}$  definido en el capítulo anterior. Al reordenar los límites de integración, tomando como valores inicial y final  $n_1 = 1$  y  $n_2 = N - 1$ , y considerando al potencial entrópico de la cadena  $U = \mathcal{F}$ , la solución hasta cuadraturas para el tiempo promedio de primer paso  $\tau$  o tiempo de transporte (translocación o retrotranslocación), es [96]:

$$\tau = \int_1^{N-1} dn \frac{b^2}{D(n)} \exp\left(\frac{\mathcal{F}(n)}{k_B T}\right) \int_1^n dm \exp\left(-\frac{\mathcal{F}(m)}{k_B T}\right). \quad (4.17)$$

Cabe notar que en la ecuación anterior, el inicio del proceso de translocación está dado por el estado en el cual un monómero ha atravesado ( $n = 1$ ), mientras

que el final del proceso es el estado en el cual solo un monómero falta por atravesar ( $n = N - 1$ ).

Los resultados para el tiempo de translocación y retrotranslocación para los tres modelos de transporte se presentan en el capítulo 6. Es importante destacar que el cálculo del tiempo de transporte requiere de la resolución de las integrales de la ecuación 4.17, cuyo resultado depende de la forma del potencial  $\mathcal{F}$ . De los tres modelos de translocación, únicamente para el sistema diluido se realizan las integrales de forma analítica (se integra en términos de funciones elementales). Los modelos de abarrotamiento estático y dinámico no son integrables de forma analítica, y por lo tanto, el cálculo del tiempo debe hacerse numéricamente. El cálculo numérico representa una desventaja ante el cálculo analítico, debido al cómputo que tarda hasta dos minutos, comparado con el analítico del orden de segundos. En nuestros cálculos, todos los tiempos de transporte se obtuvieron por medio del programa *Mathematica*, versión 8.0 [109].

## Capítulo 5

# Resultados: Validación de abarrotamiento dinámico para el medio intracelular

En este capítulo, se muestra una revisión bibliográfica de: los valores de concentración de proteínas en el citoplasma y en el lumen del retículo endoplásmico, los valores de viscosidad, el coeficiente de difusión de proteínas en el medio intracelular, y el tamaño de las preproteínas que se translocan. Los valores de concentración y los tamaños nos permiten definir los intervalos fisiológicos de abarrotamiento y de tamaño de proteínas, los cuales se utilizan para el cálculo de las variables de la translocación en el capítulo 6. Los coeficientes de difusión son utilizados para construir el coeficiente de difusión para una proteína en translocación, el cual es necesario para el cálculo de los tiempos de translocación y retrotranslocación del capítulo 6. Adicionalmente, con los datos reportados en este capítulo, mostramos que el modelo de translocación con abarrotamiento en un régimen dinámico es el que corresponde al abarrotamiento intracelular.

### 5.1. El medio intracelular se encuentra abarrotado por proteínas

En el medio intracelular se encuentran diferentes especies macromoleculares, como el ARN y las proteínas. Para dichas especies, los valores de concentración reportados son superiores a los utilizados en sistemas diluidos. En un sistema diluido la concentración de los solutos es menor a 10 mg/ml [30, 29]. En el caso de las proteínas, las macromoléculas más abundantes [62], la concentración de todas las especies de proteínas es un orden de magnitud mayor a la concentración de los sistemas diluidos, característica que define al ambiente intracelular como abarrotado por proteínas. La concentración de proteínas depende de diversos factores, algunos de los cuales son: la región dentro de la célula [17, 24], la

osmolaridad<sup>1</sup> del medio que la rodea [17, 118] y el tipo de célula. Los valores de concentración son diferentes entre especies y se encuentran en un amplio intervalo. Para células eucariotas, la concentración de proteínas del citoplasma se ha reportado entre 100 – 310 mg/ml [62, 48, 32, 11], mientras que para células procariotas, se ha reportado entre 200 – 320 mg/ml [118, 17]. Valores similares han sido reportados para el lumen del RE de células eucariotas, en un intervalo de 100 – 200 mg/ml [24, 44, 56]. Estos valores de concentración para el citoplasma y el lumen del RE, lugar donde ocurre la translocación de preproteínas, son al menos 10 veces mayores a los valores utilizados en sistemas diluidos, por lo tanto, la translocación ocurre en un ambiente abarrotado por proteínas.

Otra forma de indicar el grado de abarrotamiento por proteínas en el medio intracelular es mediante la fracción de volumen que ocupan,  $\phi$ , calculada como el producto entre la concentración  $c$  y la densidad específica de una proteína  $\rho^*$ , definida como el inverso de la densidad. En el trabajo experimental de Zimmerman y Trach [118], además de la concentración  $c$  de las proteínas del citoplasma de *E. coli*, se reporta la densidad específica  $\rho^*$ , cuyo valor es  $\rho^* = 1.2$  ml/g. Considerando a la densidad específica de las proteínas similar entre células eucariotas y procariotas, y entre el citoplasma y el lumen del RE, la fracción de volumen que ocupan las proteínas en el medio intracelular se obtiene como  $\phi = \rho^*c$ . Para definir un intervalo de la fracción de volumen de las proteínas que abarrotan, se utilizaron los valores reportados de la concentración mínima y máxima. De esta forma, la fracción de volumen que ocupan las proteínas del citoplasma se encuentra en el siguiente intervalo:

$$0.12 \leq \phi_{\text{cit}} \leq 0.38. \quad (5.1)$$

De forma similar, la fracción de volumen que ocupan las proteínas en el lumen del RE está en el intervalo:

$$0.12 \leq \phi_{\text{RE}} \leq 0.24. \quad (5.2)$$

Como resumen, en la Tabla 5.1, se muestran los valores de concentración de las proteínas que abarrotan los medios donde ocurre la translocación, al igual que la fracción del volumen que ocupan. Estos últimos valores se utilizan en los cálculos de los modelos estéricos de translocación en el capítulo 6.

## 5.2. Modelos para el coeficiente de difusión de las proteínas en el citoplasma y en el lumen del retículo endoplásmico

El tamaño de las proteínas en el medio intracelular es muy variado. Para la translocación entre el citoplasma y el lumen del RE, el rango de tamaños

<sup>1</sup>La osmolaridad o concentración molar de una sustancia está definida como la cantidad de un soluto dividida por el volumen de la solución. El prefijo osmo deriva del cambio en la presión osmótica de una célula al ser introducida en una solución.

**Tabla 5.1:** Concentración y fracción de volumen de las proteínas en el citoplasma y en el lumen del RE.

Medio	Concentración (mg/ml)	Fracción de volumen $\phi$
citoplasma	100-320	0.12-0.38
lumen del RE	100-200	0.12-0.24

va desde 70 hasta 4536 aminoácidos (desde  $\approx 7.7$  hasta  $\approx 500$  kDa [39]); ver sección 5.4. Experimentalmente, de valores reportados en la literatura, se ha encontrado para diferentes proteínas que el coeficiente de difusión en el medio intracelular depende del tamaño de la proteína y del grado de abarrotamiento [46].

Después de una extensa búsqueda del coeficiente de difusión de proteínas en el medio intracelular, al descartar datos para proteínas capaces de adherirse a la membrana o a otras proteínas, se han clasificado los valores del coeficiente de difusión de acuerdo a: 1) el medio intracelular donde se difunden, citoplasma, lumen del RE e incluso agua, 2) el tamaño de las proteínas, y 3) al grado de abarrotamiento. Estos datos se muestran a continuación y se ajustan utilizando modelos de difusión. Con estos modelos, se construye un modelo de difusión para la translocación, necesario para el cálculo de los tiempos del sistema.

### 5.2.1. Ajustes como función del tamaño $N$ al coeficiente de difusión de proteínas

En la literatura, la mayoría de los coeficientes de difusión de las proteínas son reportados utilizando la masa molecular, dada en kilodaltons. Para obtener el número de aminoácidos  $N$  de una proteína, cantidad que manejamos como el tamaño de la cadena, utilizamos uno de los siguientes procedimientos: a) la secuencia de aminoácidos de la proteína, b) la masa molecular de la proteína dividida por la masa promedio de los aminoácidos,  $\approx 113$  Da [53], o c) para el caso de proteínas construidas, tomamos en cuenta la secuencia de la proteína original y longitud del segmento adherido.

A continuación, mostramos los coeficientes de difusión de proteínas medidos experimentalmente en agua, porque son utilizados como valores de referencia para cuantificar el efecto del medio intracelular sobre la difusión de proteínas y sobre las propiedades físicas de la translocación.

#### Difusión como función del tamaño $N$ para proteínas en agua

En la Tabla 5.2, se muestra el coeficiente de difusión para diferentes proteínas en agua, medido a  $20^\circ\text{C}$  [3] y a  $22^\circ\text{C}$  [78, 72]. De acuerdo al análisis de Arrio-Dupont *et al.* [3], al ajustar los coeficientes con la ecuación de difusión de

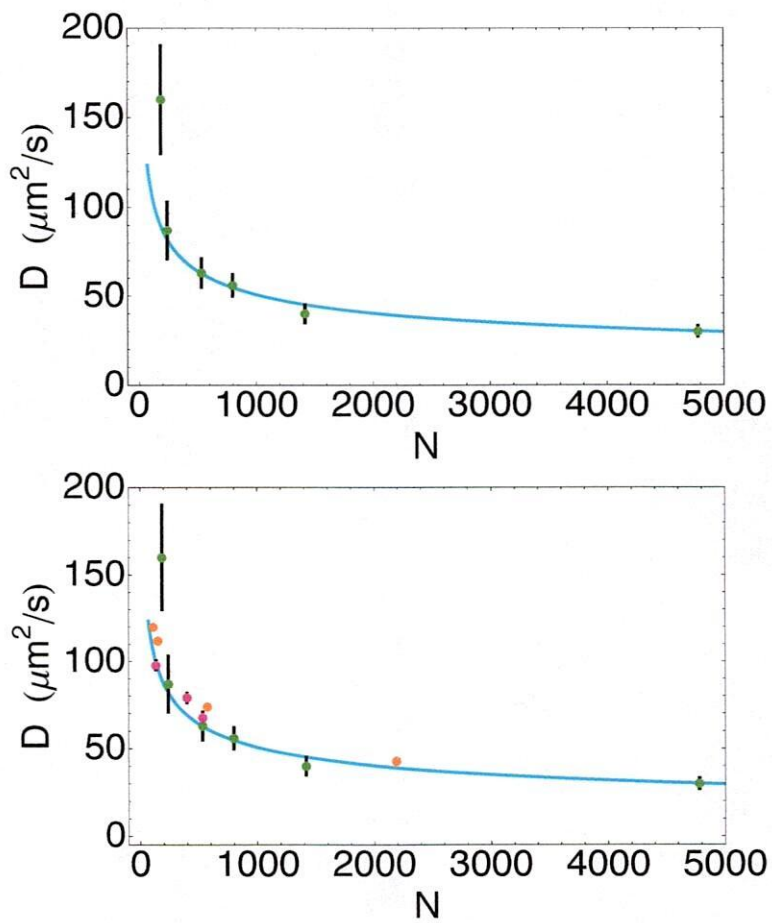
Stokes–Einstein, se encuentra que el coeficiente de difusión  $D$  es inversamente proporcional a la raíz cúbica de la masa molecular  $M$ , esto es  $D \propto M^{-1/3}$ . Nosotros ajustamos los coeficientes de difusión reportados por Arrio–Dupont *et al.*, a 20°C [3]. En el ajuste, cambiamos la dependencia de la masa molecular  $M$  por la longitud de la cadena  $N$ , basados en la relación de proporcionalidad entre la masa molecular  $M$  y el número de aminoácidos de la cadena  $N$  [53]. Para ajustar los datos, se utilizó  $D = AN^{-p}$ , fijando  $p = 1/3$  de acuerdo con el exponente en el ajuste de Arrio–Dupont *et al.*, que obedece la ley de Stokes–Einstein para la difusión de proteínas globulares. La constante  $A$  se tomó como el único parámetro ajustable.

**Tabla 5.2:** Difusión de proteínas en agua.

Proteína	$N$	$D$ ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )	$T$
Mioquinasas	186	160±30	(20°C) [3]
EGFP	289	87±16	
Fosfoglucomutasa	531	63±8	
Elonasa $\beta$	796	56±6	
IgG	1416	40±5	
Galactosidasa $\beta$	4779	30±3	
Lactoalbúmina	133	97.8±2.6	(22°C) [78]
Ovalbúmina	398	79.1±2.6	
BSA	531	67.7±2.9	
Citocromo c	110	120	(22°C) [72]
Mioglobina	150	112	
Hemoglobina	571	74	
Catalasa	2190	43	

Al realizar el ajuste por medio de mínimos cuadrados ponderados, con el software *Mathematica* versión 8.0 [109], se obtuvo para el parámetro ajustable  $A = 509.02 \pm 27 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.982$ . La curva de ajuste y los coeficientes de difusión se muestran en la parte superior de la Figura 5.1. De todos los valores, únicamente para la proteína más pequeña y la de mayor incertidumbre, la mioquinasas de  $N = 186$ , el ajuste desestima el valor experimental en un 80%; para todas las demás proteínas el ajuste predice los coeficientes de difusión dentro de la incertidumbre experimental; ver la Figura 5.1. Comparando además con los coeficientes de difusión de las proteínas reportadas a 22°C en [78, 72], los datos se encuentran cerca de la curva de ajuste, como se puede ver en la parte inferior de la Figura 5.1.

De esta manera, el ajuste para el coeficiente de difusión para proteínas en agua, o en el sistema diluido, es:



**Figura 5.1:** Coeficiente de difusión para proteínas en agua. La curva corresponde al ajuste  $D(N) = 509 N^{-1/3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Arriba: coeficientes de difusión a 20°C. Abajo: coeficientes de difusión a 20°C y 22°C.

$$D_{\text{dil}} = 509 N^{-1/3} \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}. \quad (5.3)$$

### Difusión como función del tamaño $N$ para proteínas en el citoplasma

El coeficiente de difusión  $D$  medido experimentalmente en el citoplasma de células eucariotas, para proteínas de diferente tamaño, se muestra en la Tabla 5.3. Los valores reportados en la literatura están medidos en distintas células a diferentes temperaturas. Como función de la temperatura, para el caso de la proteína mioglobina, se mostró que el coeficiente de difusión medido a  $37^\circ\text{C}$  en el citoplasma de células del músculo sóleo resultó ser 1.8 veces mayor al coeficiente de difusión medido a  $22^\circ\text{C}$  [72]. Este resultado indica que existe una dependencia importante del coeficiente de difusión en la temperatura. En la Tabla 5.3, se indican los coeficientes de difusión para temperaturas similares,  $20^\circ\text{C}$  y  $22^\circ\text{C}$ , y se ha indicado el tipo de célula. De los datos se observa que al aumentar la longitud de la proteína disminuye el coeficiente de difusión.

**Tabla 5.3:** Coeficiente de difusión para proteínas en el citoplasma de células eucariotas.

Célula	Proteína	$N$	$D$ ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )	$T$
Músculo	EGFP	239	$15.8 \pm 3$	$(20^\circ\text{C})$ [3]
	Fosfoglucomutasa	531	$16.5 \pm 3$	
	Enolase $\beta$	796	$10.8 \pm 2$	
	IgG	1416	$5.5 \pm 1.0$	
Neurona de <i>Xenopus</i>	Lactoalbúmina	133	$22.8 \pm 1.7$	$(20^\circ\text{C})$ [78]
	Ovalbúmina	398	$15.8 \pm 2.1$	
	BSA	531	$12.6 \pm 1.5$	
Músculo sóleo	Citocromo c	110	$13.0 \pm 0.6$	$(22^\circ\text{C})$ [72]
	Mioglobina	150	$12.5 \pm 1.3$	
	Hemoglobina	571	$6.3 \pm 0.5$	
	Catalasa	2190	$2.6 \pm 0.4$	
Músculo sóleo con contracciones	Mioglobina	150	$13.3 \pm 0.7$	$(22^\circ\text{C})$ [71]
Músculo sóleo	Mioglobina	150	$22.0 \pm 1.2$	$(37^\circ\text{C})$ [72]
Músculo extensor largo	Citocromo c	110	$16.2 \pm 0.6$	$(22^\circ\text{C})$ [72]
	Mioglobina	150	$18.7 \pm 0.8$	
	Hemoglobina	571	$6.2 \pm 0.4$	
	Catalasa	2190	$1.9 \pm 0.2$	

Los coeficientes de la Tabla 5.3 fueron ajustados utilizando el modelo de Zimm de la difusión de polímeros, en el cual, el coeficiente de difusión  $D$  es inversamente proporcional a la potencia  $\nu > 0$  de la longitud  $N$  del polímero [26].

El modelo de Zimm, dado por  $D = AN^{-\nu}$ , puede utilizarse con dos parámetros ajustables, la constante  $A$  y el exponente  $\nu$ ; cuyo valor depende del tipo de solvente donde se encuentra la cadena [26]. Al realizar el ajuste de los coeficientes de difusión con dos parámetros libres, mediante el software *Mathematica*, se obtuvo  $A = 344 \pm 226 \mu\text{m}^2/\text{s}$  y  $\nu = 0.59 \pm 0.11$ . Para verificar la calidad del ajuste, se calculó el coeficiente de determinación, cuyo valor es  $R^2 = 0.973$ . En este ajuste con dos parámetros, la desviación estándar del parámetro  $A$  es muy grande, pero el exponente  $\nu = 0.59$  tiene una desviación estándar pequeña. Numéricamente, el exponente es similar al valor  $1/2$ , que corresponde, en el modelo de Zimm, a un sistema formado por cadenas ideales sin interacción mutua, debido a que el solvente se encuentra a la condición  $\Theta$ , cuando las interacciones repulsivas y atractivas de los segmentos de cadena se cancelan [26]. Repetimos el cálculo con un solo parámetro libre, tomando como valor de referencia para el exponente  $\nu = 1/2$ . Para la constante de ajuste, se obtuvo  $A = 198 \pm 21 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , la cual tiene una menor desviación estándar, con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.972$ . El ajuste para el coeficiente de difusión para proteínas en el citoplasma, como función del tamaño  $N$ , utilizado para nuestros cálculos es:

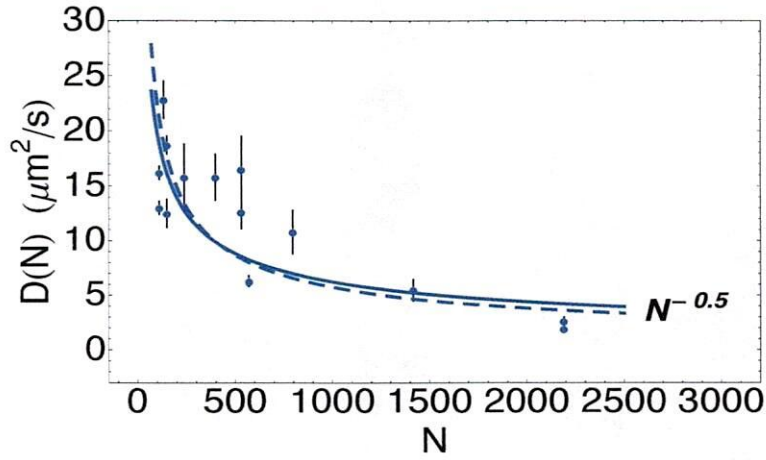
$$D_{\text{cit}}(N) = 198 N^{-0.5} \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}. \quad (5.4)$$

En la Figura 5.2, se indican los coeficientes de difusión y los ajustes realizados con el modelo de Zimm, cuando se utilizó un parámetro libre (línea continua) y dos parámetros libres (línea punteada). Se puede observar la dispersión de los datos alrededor de ambos ajustes.

### Difusión como función del tamaño $N$ para proteínas en el lumen del RE

En la literatura, se ha reportado el coeficiente de difusión para proteínas en el lumen del RE de células bajo tratamiento con sustancias, con el objeto de cuantificar cambios estructurales o la funcionalidad del RE por la acción del tratamiento [24, 93, 49, 41]. En la Tabla 5.4, se muestran los coeficientes de difusión reportados para células en condiciones normales, medidos a  $37^\circ\text{C}$ , excepto para la GFP reportada a  $23^\circ\text{C}$ . En la Tabla, se indica el nombre de la proteína y su tamaño, y se observa que el coeficiente de difusión disminuye al aumentar el tamaño.

Los datos de la Tabla 5.4 fueron ajustados con el modelo de Zimm,  $D = AN^{-\nu}$ . Del ajuste con dos parámetros libres,  $A$  y  $\nu$ , se obtuvo  $A = 8477.15 \pm 12484.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$  y  $\nu = 1.2396 \pm 0.2578$ , con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.917$ . Con dos parámetros libres, la desviación estándar de la constante  $A$  resulta más grande que el propio valor. Para el exponente, su valor es similar a  $\nu = 1$ , que corresponde al modelo de Rouse en el cual se desprecia la interacción hidrodinámica del solvente con un polímero en difusión [26]. Tomando  $\nu = 1$  como valor de referencia, repetimos el ajuste con un parámetro libre,  $A$ . En este caso, se obtuvo  $A = 2139.51 \pm 168.40 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , con un coeficiente de determinación



**Figura 5.2:** Coeficiente de difusión para proteínas en el citoplasma como función del tamaño  $N$ . Línea punteada: ajuste con dos parámetros,  $D(N) = 344 N^{-0.59} \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Línea continua: ajuste con un parámetro,  $D(N) = 198 N^{-0.5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

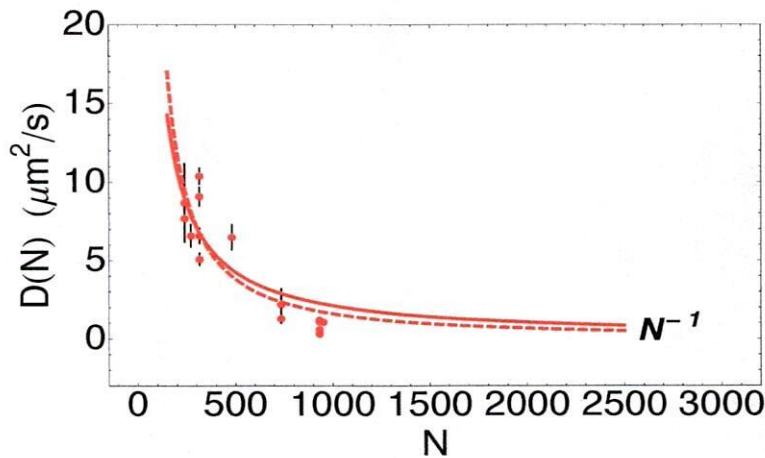
**Tabla 5.4:** Coeficiente de difusión para proteínas en el lumen del RE en diferentes células.

Célula	Proteína	$N$	$D$ ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )
CHO-K1 [24]	GFP (23°C)	238	$7.5 \pm 2.5$
K41-K42 [93]	ER-GFP	270	$8.7 \pm 2.5$
	Crt-GFP	734	$1.3 \pm 0.3$
	Crt-Y109F-GFP	734	$2.2 \pm 1.0$
HepG2 [49]	ER-GFP	264	$6.6 \pm 0.7$
	ER-RFP	270	$9.1 \pm 0.6$
	BiP-GFP	932	$0.60 \pm 0.06$
	[41] ER-RFP	264	$6.5 \pm 0.8$
	hamBiP-sfGFP-KDEL	932	$1.08 \pm 0.10$
Cos7 [49]	ER-RFP	264	$9.1 \pm 0.5$
	ER-RFP	264	$10.4 \pm 0.5$
	BiP-GFP	932	$1.1 \pm 0.1$
	BiP-GFP	932	$1.2 \pm 0.2$
MDCK [49]	ER-RFP	264	$5.1 \pm 0.4$
	BiP-GFP	932	$0.32 \pm 0.03$
U2-OS [49]	ER-RFP	264	$6.6 \pm 0.5$
	BiP-GFP	932	$0.37 \pm 0.03$

$R^2 = 0.910$ . De esta manera, el ajuste utilizado en nuestros cálculos para el coeficiente de difusión para proteínas en el lumen del RE, como función del tamaño  $N$ , es:

$$D_{RE}(N) = 2139.51 N^{-1} \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}. \quad (5.5)$$

En la Figura 5.3, se indican los valores del coeficiente de difusión y los ajustes realizados con el modelo de Zimm, con dos parámetros (línea punteada) y con un parámetro (línea continua). En la Figura, se observa la dispersión de los datos alrededor de ambos ajustes.

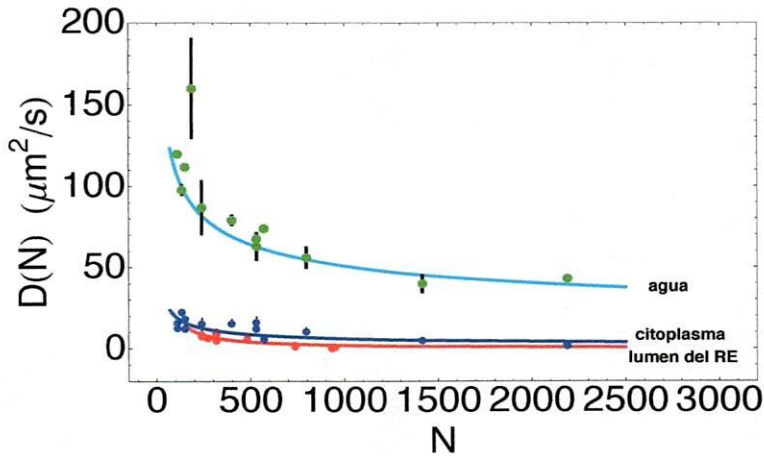


**Figura 5.3:** Coeficiente de difusión para proteínas en el lumen del RE como función del tamaño  $N$ . Línea punteada: ajuste con dos parámetros,  $D(N) = 8477.15 N^{-1.24} \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Línea continua: ajuste con un parámetro,  $D(N) = 2139.51 N^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

### Comparación de los coeficientes de difusión de las proteínas en los tres medios

En los tres apartados anteriores se presentaron los coeficientes de difusión para proteínas en tres medios diferentes: un medio diluido, agua, y dos medio intracelulares abarrotados por proteínas, el citoplasma y el lumen del retículo endoplásmico. Al comparar los valores de la Tablas 5.2, 5.3 y 5.4, se observa que el agua es el medio donde hay mayor difusión y el lumen del retículo el de menor difusión; la diferencia entre la difusión en el citoplasma y en el lumen del RE es mínima. Esto se ilustra en la Figura 5.4, donde se han indicado los datos y los ajustes correspondientes utilizando el modelo de Zimm. En la sección 5.6, se indica que el citoplasma es un medio más viscoso que el agua; en consecuencia, junto con el abarrotamiento por proteínas, el coeficiente de

difusión de las proteínas es menor que en agua. Para el caso del lumen del RE, el grado de abarrotamiento es similar al del citoplasma, pero con una difusión menor para las proteínas. Esto puede deberse a una mayor viscosidad del lumen del RE o a otros factores, como la estructura del lumen o a factores de adhesión entre proteínas [24].



**Figura 5.4:** Coeficiente de difusión para proteínas en tres medios, uno diluido (agua) y dos medios intracelulares abarrotados por proteínas, el citoplasma y el lumen del RE. Las líneas son los ajustes utilizando el modelo de Zimm  $D(N) = AN^{-\nu}$ .

### 5.2.2. Ajustes al coeficiente de difusión para proteínas como función del grado de abarrotamiento $\phi$

Además del tamaño y la temperatura, el coeficiente de difusión depende de la concentración de los solutos del medio. En las células, la concentración de proteínas, y por lo tanto, la fracción de volumen que ocupan  $\phi$ , se cambia regulando la osmolaridad del medio extracelular, que modifica el tamaño de la célula encongiendola para altas osmolaridades [24, 46, 45], o también, mediante tratamiento farmacológico con efectores capaces de modificar la estructura o el ambiente del lumen del RE [24, 49]. A continuación, mostramos los coeficientes de difusión como función de la fracción del volumen de los agentes abarrotantes del citoplasma y del lumen del RE.

#### Difusión como función de la fracción de volumen $\phi$ de las proteínas que abarrotan el citoplasma

En la literatura, los trabajos de Konopka *et al.* [46, 45] son los únicos donde se mide experimentalmente la difusión de una proteína como función de la

concentración o fracción de volumen  $\phi$  de las macromoléculas que abarrotan el citoplasma. En el citoplasma de *E. coli*, el coeficiente de difusión de la GFP resultó depender de la forma en la cual se cambian las condiciones de osmolaridad del medio externo a la célula, si la osmolaridad cambia abruptamente el cambio en el coeficiente de difusión es más intenso [46]. En la Tabla 5.5, se muestran los coeficientes de difusión de la GFP reportados por Konopka *et al.* [46], como función de la fracción de volumen de las macromoléculas abarrotantes  $\phi$ , para células adaptadas a altas osmolaridades.

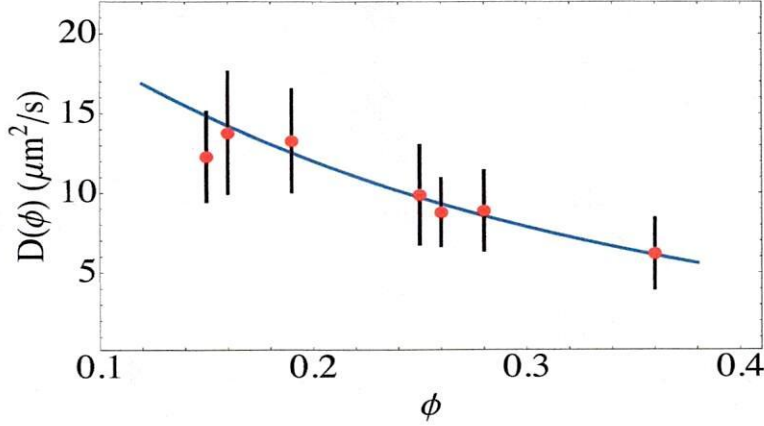
**Tabla 5.5:** Coeficiente de difusión de la GFP en el citoplasma de *E. coli*, como función de la fracción de volumen  $\phi$ . Datos tomados de la referencia [46], para células adaptadas a altas osmolaridades.

$\phi$	$D$ ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )
0.15	$12.3 \pm 2.8$
0.16	$13.8 \pm 3.8$
0.19	$13.3 \pm 3.2$
0.25	$9.9 \pm 3.1$
0.26	$8.8 \pm 2.1$
0.28	$8.9 \pm 2.5$
0.36	$6.2 \pm 2.2$

Los datos de la Tabla 5.5 se ajustaron con el modelo exponencial  $D(\phi) = Ae^{-\alpha\phi}$ , modelo que ajusta datos experimentales del coeficiente de difusión de proteínas en sistemas artificiales abarrotados por proteínas a concentraciones fisiológicas [23, 5]. Del ajuste se obtuvo  $A = 28.08 \pm 13.40 \mu\text{m}^2/\text{s}$  y  $\alpha = 4.23 \pm 1.93$ , con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.998$ . Asumiendo que la difusión en el citoplasma como función de la fracción de volumen de los agentes abarrotantes  $\phi$  es similar entre eucariontes y procariontes, entonces, el modelo de coeficiente de difusión para el citoplasma como función de  $\phi$ , utilizado en nuestros cálculos, es:

$$D_{\text{cit}}(\phi) = 28.08 e^{-4.23\phi \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}}. \quad (5.6)$$

En la Figura 5.5, se indican los valores del coeficiente de difusión y el ajuste exponencial. Todos los datos caen sobre la curva de ajuste, dentro de la incertidumbre experimental. Como característica adicional, los coeficientes de difusión ajustados están medidos dentro del intervalo fisiológico de los valores de la fracción de volumen  $\phi$ , el cual se considera en todos en nuestros cálculos.



**Figura 5.5:** Coeficiente de difusión para proteínas en el citoplasma de *E. coli*, como función de  $\phi$ . La línea representa el ajuste  $D(\phi) = 28.08 e^{-4.23\phi} \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

### Difusión como función de la fracción de volumen $\phi$ de las proteínas que abarrotan el lumen del RE

Para proteínas en el lumen del RE, no existen valores medidos de forma directa para la difusión como función de la concentración de proteínas, o de la fracción de volumen  $\phi$ . Para modelar el coeficiente de difusión de proteínas en el lumen del RE como función de  $\phi$ , procedimos de la siguiente forma: i) relacionamos la reducción del coeficiente de difusión de la GFP por cambios en la osmolaridad con un aumento en la concentración de proteínas y ii) asumimos un decrecimiento exponencial del coeficiente de difusión como función de la fracción de volumen  $\phi$ , como sucede en el citoplasma de *E. coli*.

En sus experimentos, Dayel *et al.* encontraron una reducción de hasta un 23% para el coeficiente de difusión de la GFP en el lumen del RE, cuando aumentaron la osmolaridad extracelular de 0.15 hasta 0.60 osm [24]. En *E. coli*, los cambios de la osmolaridad extracelular desde 0.3 hasta aproximadamente 1.2 osm, incrementan de forma lineal la concentración de proteínas [17]. Asumiendo este tipo de comportamiento para la concentración de proteínas como función de la osmolaridad en los experimentos de Dayel *et al.*, estimamos para el coeficiente de difusión de la GFP, a la menor y a la mayor fracción de volumen  $\phi$  de proteínas en el lumen:  $D_{\text{RE}}(\phi = 0.12) = 7.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  y  $D_{\text{RE}}(\phi = 0.24) = 5.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Con estos valores, asumiendo un cambio exponencial para el coeficiente de difusión, como sucede en el citoplasma de *E. coli* (ver ecuación 5.6), el modelo para el coeficiente de difusión en el lumen del RE, como función de la fracción de volumen  $\phi$  de las proteínas que abarrotan, es:

$$D_{\text{RE}}(\phi) = 9.70 e^{-2.14\phi} \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}. \quad (5.7)$$

### 5.2.3. El coeficiente de difusión para proteínas como función del tamaño $N$ y de la fracción de volumen $\phi$

Las proteínas que se translocan pasan del citoplasma al lumen del RE, o a la inversa durante la retrotranslocación. Las proteínas en transporte son de tamaño diferente y se encuentran rodeadas por proteínas a diferentes concentraciones. En nuestros modelos, para calcular las propiedades físicas que caracterizan el transporte, es necesario conocer el coeficiente de difusión como función del tamaño  $N$  de la cadena y de la fracción de volumen  $\phi$  que ocupan las proteínas del medio intracelular. Actualmente, no existen experimentos que reporten simultáneamente la dependencia en ambos parámetros  $N$  y  $\phi$ , para el citoplasma o para el lumen del RE. Experimentalmente, y de los ajustes descritos en los apartados anteriores de esta sección, se ha mostrado por separado la dependencia en  $N$  y en  $\phi$ .

Para construir un modelo para el coeficiente de difusión que dependa de  $N$  y de  $\phi$ , nos basamos en resultados experimentales para la difusión de proteínas de diferente tamaño en ambientes artificiales abarrotados por proteínas o polímeros a concentraciones fisiológicas que simulan el abarrotamiento intracelular [23, 5]. Los resultados indican que el coeficiente de difusión depende principalmente de dos cantidades, la primera es el tamaño de la partícula que se difunde en el solvente de interés, y la segunda es la fracción de volumen  $\phi$  que ocupan los agentes abarrotantes de tamaño  $a$  [23, 5]. En caso de que el medio abarrotado presente estructura, este factor también debe tomarse en cuenta [5]. En los resultados experimentales de Dauty y Verkman y de Banks y Fradin [23, 5], la dependencia en  $N$  y  $\phi$  es separable, y por lo tanto, el coeficiente de difusión para proteínas en medios abarrotados de proteínas queda como  $D(N, \phi) = D_0(N)f(\phi, a)$  [75], con  $D_0(N)$  representando el coeficiente de difusión en un solvente puro. La función  $f(\phi, a)$ , de ajustes a datos experimentales, ha resultado una exponencial alargada del tipo  $f(\phi, a) = e^{-B\phi^\delta}$ , con  $B$  una constante numérica y  $\delta$  una cantidad que depende del tamaño  $a$  de los agentes abarrotantes [23, 5]. Tomando para  $D_0(N)$  los ajustes al coeficiente de difusión para el citoplasma y el lumen, dados por el modelo de Zimm  $D(N) = AN^{-\nu}$ , podemos escribir un modelo para el coeficiente de difusión  $D(N, \phi)$ , como función de  $N$  y  $\phi$ , dado por:

$$D(N, \phi) = A_0 N^{-\nu} e^{-B\phi^\delta}. \quad (5.8)$$

En este modelo,  $A_0$  resulta el único parámetro ajustable, ya que  $\nu$  y  $B$  han sido determinados anteriormente cuando se analizó la dependencia en  $N$  y  $\phi$ , y el valor de  $\delta$  debe ser 1 para concordar con la dependencia exponencial en  $\phi$  presentada en la ecuaciones 5.6 y 5.7. Para obtener la constante  $A_0$ , utilizamos el coeficiente de difusión de una proteína de referencia, como el coeficiente de difusión de la GFP.

Para el modelo  $D_{\text{cit}}(N, \phi)$  en el citoplasma, utilizamos el coeficiente de difusión de la GFP de  $N_{\text{GFP}} = 238$ ,  $D_{\text{GFP}} = 9.9 \mu\text{m}^2/\text{s}$  a la fracción de volumen  $\phi^* = 0.25$ . Al resolver la igualdad  $9.9 \mu\text{m}^2/\text{s} = A_0 N_{\text{GFP}}^{-0.5} e^{-4.23\phi^*}$ , de la ecuación 5.8, obtenemos la constante  $A_0 = 433 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . De esta forma, el modelo para el

coeficiente de difusión para proteínas en el citoplasma como función de  $N$  y  $\phi$ , es:

$$D_{\text{cit}}(N, \phi) = 433 N^{-0.5} e^{-4.23\phi} \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}. \quad (5.9)$$

Para el modelo  $D_{\text{RE}}(N, \phi)$  en el lumen del RE, de forma similar, utilizando el coeficiente de difusión de la GFP,  $D_{\text{GFP}} = 7.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , a la fracción de volumen  $\phi^* = 0.12$ , obtenemos de resolver  $7.5 \mu\text{m}^2/\text{s} = A_0 N_{\text{GFP}}^{-1} e^{-2.14\phi^*}$ , la constante  $A_0 = 2308 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . De esta manera, el modelo para el coeficiente de difusión para proteínas en el lumen del RE como función de  $N$  y  $\phi$ , es:

$$D_{\text{RE}}(N, \phi) = 2308 N^{-1} e^{-2.14\phi} \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}. \quad (5.10)$$

### 5.3. Modelo para el coeficiente de difusión de una preproteína en translocación

En la sección anterior, Sección 5.2, se construyeron modelos para el coeficiente de difusión de proteínas moviéndose en el citoplasma o el lumen del RE. Durante la translocación o la retrotranslocación, una preproteína tiene segmentos de cadena en ambos lados de la membrana, y por lo tanto, el movimiento de toda la cadena depende de la movilidad de sus segmentos en el citoplasma y en el lumen del RE. Si la interacción del canal con la preproteína es únicamente estérica, entonces el canal no ralentiza ni acelera el transporte sino sólo restringe las conformaciones de la cadena. Por lo tanto, el movimiento de la cadena es dirigido únicamente por la movilidad de sus segmentos en los medios donde se encuentran, debido al coeficiente de difusión. En consecuencia, el coeficiente de difusión durante la translocación debe ser función del número de segmentos  $n$  que atraviesan la membrana:  $D(n)$ . Para construir el coeficiente de difusión  $D(n)$  dependiente de la variable de translocación  $n$ , utilizamos un modelo propuesto por Sung y Park [96] y los modelos descritos en la sección anterior para el coeficiente de difusión  $D(N, \phi)$ .

Al inicio del transporte, la mayoría de los segmentos de la cadena se encuentra en el lado *cis*; por lo tanto, la movilidad de la cadena depende principalmente de la movilidad de los segmentos en el lado *cis*. Al final del transporte, la mayoría de los segmentos de la cadena se encuentra en el lado *trans*, y de forma similar, la movilidad de la cadena depende principalmente de la movilidad en el lado *trans*. Un modelo heurístico, basado en la movilidad de los segmentos de cadena  $N - n$  y  $n$ , en los lados *cis* y *trans*, respectivamente, es el propuesto por Sung y Park [96]. Su modelo, construido como un promedio de los coeficientes de difusión en los lados *cis* y *trans*, y que considera coeficientes constantes, está dado como [96]:

$$\frac{1}{D(n)} = \frac{n}{N} \frac{1}{D_{\text{trans}}} + \frac{N - n}{N} \frac{1}{D_{\text{cis}}}. \quad (5.11)$$

Este modelo de Sung y Park recupera el coeficiente de difusión del lado *cis* y del lado *trans* cuando la cadena se encuentra completamente en el lado *cis* o en el lado *trans*. Al inicio del transporte se tiene  $n = 0$ , lo cual da  $D(0) = D_{cis}$ , y al final se tiene  $n = N$ , lo cual da  $D(N) = D_{trans}$ .

En la sección anterior, al analizar el coeficiente de difusión para proteínas, se mostró que no es constante y que depende de: 1) el medio intracelular, citoplasma o lumen del RE, 2) el tamaño de la cadena  $N$  y 3) el grado de abarrotamiento  $\phi$  en el medio. Tomando en cuenta la dependencia del medio, en  $N$  y en  $\phi$ , nosotros generalizamos el modelo de Sung y Park para el coeficiente de difusión, al remplazar  $D_{cis}$  y  $D_{trans}$  por  $D_{cit}(N, \phi_{cit})$  y  $D_{RE}(N, \phi_{RE})$ . De esta manera, el coeficiente de difusión para una cadena en transporte depende de la longitud de la cadena  $N$ , del número de monómeros que atraviesan la membrana  $n$ , y del grado de abarrotamiento en los lados *cis* y *trans*,  $\phi_{cis}$  y  $\phi_{trans}$ . El modelo generalizado para el coeficiente de difusión durante el transporte,  $D(n, N, \phi_{cis}, \phi_{trans})$ , está dado por [75]:

$$\frac{1}{D(n, N, \phi_{cis}, \phi_{trans})} = \frac{n}{N} \frac{1}{D_{trans}(N, \phi_{trans})} + \frac{N-n}{N} \frac{1}{D_{cis}(N, \phi_{cis})}. \quad (5.12)$$

En translocación, los lados *cis* y *trans* corresponden respectivamente al citoplasma (cit) y al lumen del retículo endoplasmico (RE); en este caso los coeficientes de difusión  $D_{cis}(N, \phi_{cis})$  y  $D_{trans}(N, \phi_{trans})$  están dados por las expresiones para el coeficiente de difusión de proteínas en el citoplasma y en el lumen del RE,  $D_{cit}(N, \phi_{cit})$  y  $D_{RE}(N, \phi_{RE})$ , las ecuaciones 5.9 y 5.10. Para retrotranslocación, los lados se intercambian y en las expresiones para el coeficiente de difusión se realiza la sustitución  $cis \rightarrow RE$  y  $trans \rightarrow cit$ .

En nuestros modelos, para el cálculo de los tiempos de transporte en el siguiente capítulo, se utilizó este modelo para el coeficiente de difusión de una preproteína en transporte, la ecuación 5.12.

## 5.4. Longitud de las cadenas translocadas hacia el lumen del retículo endoplásmico

En el lumen del retículo endoplasmico ocurre el plegamiento de las proteínas que ingresan por translocación. En el lumen, se encuentran proteínas de diferente tamaño, las más grandes de hasta 500 kDa [39], y las más pequeñas, de masas cercanas a los 10 kDa. Una de las proteínas más pequeñas translocadas hacia el lumen del RE es la prepromelitina, que consta de 77 aminoácidos con una masa molecular de 7.7 kDa [116, 95] y es precursora de la proteína de secreción melitina. Otra proteína pequeña, pero de mayor tamaño y residente en el lumen, es ERp18 de 157 aminoácidos con masa molecular 18 kDa [88, 42]. Existe también una amplia variedad de proteínas de tamaño promedio como las chaperonas del plegamiento indicadas en la sección 1.2, entre ellas, Ero1p de 560 aminoácidos con masa 65 kDa [38, 34]. Entre las proteínas más grandes encontradas en el retículo endoplásmico está ApoB, una lipoproteína de 4536

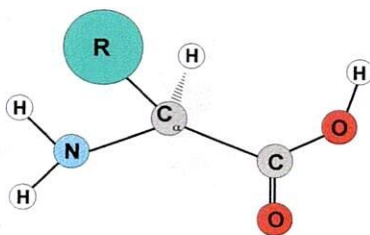
aminoácidos [57, 112, 111]. Tomando en cuenta estas proteínas, definimos el intervalo de tamaños de las preproteínas translocadas hacia el lumen del RE en términos del número de aminoácidos  $N$ ; el intervalo de tamaños correspondiente es:

$$77 \leq N \leq 4536. \quad (5.13)$$

Este intervalo de valores es utilizado en los cálculos para estudiar el efecto del abarrotamiento sobre cadenas de diferente tamaño. Como valores de referencia, se consideran los tamaños de la prepromelitina, ERp18, Ero1p, y ApoB, proteínas de tamaño pequeño, promedio y grande.

## 5.5. Distancia entre dos aminoácidos

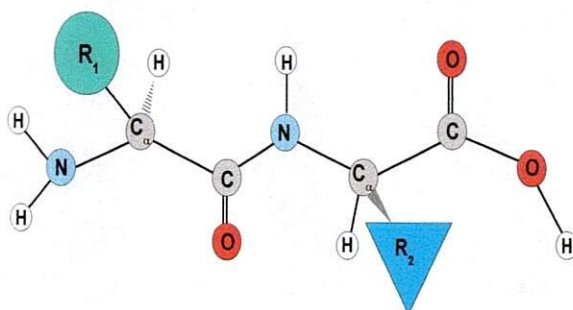
En una preproteína o cadena peptídica, los monómeros que la forman son los aminoácidos. Un aminoácido está formado por un átomo central de carbono, denotado como  $C_\alpha$ , unido con un átomo de hidrógeno (H), un grupo amino ( $NH_2$ ), un grupo carboxil ( $COOH$ ), y una estructura molecular llamada cadena lateral (R) [9, 13], ver Figura 5.6. Un aminoácido se distingue de otros mediante su cadena lateral R. En el código genético son 20 los aminoácidos especificados, aunque otros pueden ocurrir por modificación enzimática después de la traducción [9].



**Figura 5.6:** Estructura básica de un aminoácido.

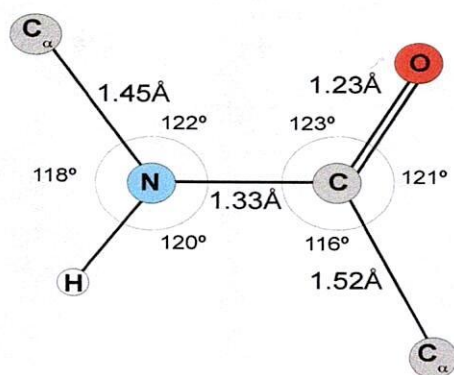
Dos aminoácidos pueden unirse mediante una reacción de hidrólisis, al enlazar el carbono del grupo carboxil de un aminoácido con el nitrógeno del grupo amino del otro aminoácido, liberando una molécula de agua [9, 13]. El enlace formado se conoce como enlace peptídico y la estructura resultante se muestra en la Figura 5.7.

El enlace peptídico formado entre el carbono y el nitrógeno es estable, debido a la deslocalización de electrones de la estructura de resonancia formada, que incrementa la polaridad y genera un carácter parcial de doble enlace [76]. Esta resonancia hace que los átomos de nitrógeno y carbono en el enlace peptídico, junto con el oxígeno del carbono permanezcan coplanares. En consecuencia, los átomos del enlace peptídico y los átomos de carbono  $\alpha$  se encuentran alineados



**Figura 5.7:** Unión de dos aminoácidos.

en un plano rígido llamado plano peptídico o plano amídico [9, 76]. Las cadenas laterales pueden rotar libremente a lo largo de las direcciones de los enlaces  $N-C_{\alpha}$  y  $C-C_{\alpha}$ , siempre que no haya interferencia estérica. En la Figura 5.8, se muestra la distribución de los átomos en el plano, las longitudes de los enlaces y los ángulos relativos entre átomos. Debido a la rigidez de los enlaces entre átomos del plano peptídico, la distancia entre los átomos de carbono  $\alpha$  es constante [76]; esta distancia es utilizada como la longitud de un aminoácido o como la distancia entre dos aminoácidos consecutivos a lo largo de la cadena peptídica. De acuerdo a la longitud de los enlaces y a los ángulos relativos entre átomos, la distancia entre dos aminoácidos o la longitud de monómero es  $b = 3.79 \text{ \AA}$ . Esta longitud es utilizada en nuestros cálculos.



**Figura 5.8:** El plano peptídico está definido por los átomos del enlace peptídico y los átomos de carbono  $\alpha$  de cada aminoácido. Las longitudes de los enlaces fueron tomadas de la referencia [76].

## 5.6. Viscosidad del medio intracelular

La viscosidad del citoplasma ha sido medida en diferentes células. Los valores reportados se encuentran distribuidos en un amplio intervalo, y son mayores a la viscosidad del agua ( $1 \text{ cP} = 1.0 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ), desde unas cuantas veces [78, 50, 97, 60, 79, 43], hasta cientos de veces, como sucede con la viscosidad medida en células de embriones en desarrollo de *Caenorhabditis elegans* [22, 60]. La viscosidad del medio intracelular se mide indirectamente a través del coeficiente de difusión de solutos de prueba, y es dependiente de la temperatura del medio [71]. En la Tabla 5.6, se muestran valores reportados para la viscosidad del citoplasma de células eucariotas, para los cuales se realizó una búsqueda extensa. En la Tabla se indica el tipo de célula y la temperatura a la cual se realizó el experimento.

**Tabla 5.6:** Viscosidad del citoplasma de células eucariotas.

Célula	Viscosidad (cP)	Temperatura (°C)
Neuronas de Xenopus [78]	5	20
Hepatoma HTC [50]	8.1	23
CHO [97]	1.5–3.2	37
Swiss 3T3 y BHK [60]	2.0–3.0	37
Eritrocitos humanos [79]	2.1–2.7	37
HeLa [43]	2.0–44	37
Swiss 3T3 [43]	0.88–24	37
Hepatocito de rata [80]	20	22
Fibroblasto humano [108]	70	20
Embriones de <i>C. elegans</i> [22]	$1 \times 10^3$	25

Para el caso del lumen del RE no se han reportados valores experimentales de la viscosidad. Análisis basados en una difusión menor de las proteínas en el lumen del RE, indican una mayor viscosidad para el lumen [24, 52]. Para proteínas construidas mediante la GFP con una secuencia de retención específica para el lumen del RE, Dayel *et al.* encontraron que el coeficiente de difusión en el lumen es menor comparado con el coeficiente en el citoplasma de entre tres a seis veces [24]. Dayel *et al.* indican que este resultado puede deberse en mayor parte a las colisiones que dan origen a adhesión entre moléculas y también a una mayor viscosidad del lumen del RE [24].

Un trabajo de simulación, que utiliza resultados experimentales de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP) y que ha reproducido valores experimentales del coeficiente de difusión, indica que el valor de la viscosidad es al menos 2.5 veces mayor que la viscosidad del agua [89].

Si asumimos que la reducción de la movilidad de diferentes proteínas en el lumen del RE (comparada con la movilidad en el citoplasma, como se muestra en la Figura 5.4) se debe en parte a la viscosidad, entonces la viscosidad del

lumen del RE resulta del mismo orden de magnitud o mayor a la viscosidad del citoplasma, y por lo tanto, mayor a la viscosidad del agua. Basados en la reducción en la movilidad de las proteínas, y debido a la falta de valores medidos experimentalmente (a nuestro saber), consideraremos la viscosidad del lumen del RE similar o mayor a la viscosidad del citoplasma.

Los valores de viscosidad son utilizados para el cálculo de los tiempos característicos de la translocación, y con ellos se define el tipo de abarrotamiento intracelular, como se indica en la siguiente sección.

## 5.7. El medio intracelular es un medio abarrotado en un régimen dinámico

El modelo de Gopinathan y Kim considera la translocación de un polímero en un ambiente abarrotado por agentes esféricos [35]. En su trabajo, Gopinathan y Kim consideran condiciones de abarrotamiento diferentes en ambos lados de la membrana, pero asumiendo durante el transporte un solo valor constante para el coeficiente de difusión de la cadena en ambos medios. La movilidad de los agentes abarrotantes durante la translocación se incluye al considerar dos casos límites. En el primer caso, llamado régimen dinámico, los agentes abarrotantes presentan una alta movilidad, mientras que en el segundo, llamado régimen estático, los agentes se mueven muy lentamente y parecen carecer de movimiento. La forma para distinguir entre un régimen y otro es mediante la comparación de tres tiempos característicos asociados al proceso de translocación. En su trabajo, Gopinathan y Kim calculan el tiempo de translocación para un polímero en los regímenes dinámico y estático, asumiendo uno u otro régimen. Sus resultados muestran una clara diferencia en el tiempo de translocación entre ambos regímenes, dependiendo de los fracciones de volumen  $\phi_{cis}$  y  $\phi_{trans}$ .

Nosotros utilizamos el modelo de Gopinathan y Kim para estudiar el efecto estérico del abarrotamiento por proteínas del medio intracelular sobre la translocación y la retrotranslocación de preproteínas. Para ello, hemos tomado en cuenta valores reportados experimentalmente del grado de abarrotamiento por proteínas  $\phi$ , del coeficiente de difusión de las proteínas en el citoplasma  $D_{cit}$  y en el lumen del RE  $D_{RE}$ , y de la viscosidad del medio intracelular  $\eta$ . En esta sección, utilizamos dichos valores para comparar los tres tiempos que definen a cada régimen y para validar que el abarrotamiento por proteínas del citoplasma y del lumen del RE se encuentra en un régimen dinámico debido a las propiedades físicas del medio intracelular.

### 5.7.1. Los tiempos característicos de la translocación

Durante la translocación de una preproteína se identifican tres tiempos característicos intrínsecos al sistema de translocación. El primero, corresponde al tiempo necesario para que la cadena atraviese la membrana, definido como el tiempo de translocación  $\tau$ . En nuestros modelos,  $\tau$  depende de la difusión de la cadena, la energía libre, y la longitud de monómero. El segundo tiempo,  $\tau_0$ ,

es un tiempo característico asociado al movimiento por difusión de los agentes abarrotantes que obstaculizan la translocación de una cadena. Si  $\tau_o$  es pequeño, significa que las proteínas que abarrotan recorren grandes distancias en poco tiempo debido a su alta difusividad; si  $\tau_o$  es grande, las proteínas requieren más tiempo para recorrer la misma distancia debido a una difusión baja. El tercero corresponde al tiempo necesario para que una cadena acceda a todas sus posibles conformaciones, tomando en cuenta las restricciones sobre la cadena; este tiempo es llamado tiempo relajación de la cadena  $\tau_r$ . Si  $\tau_r$  es pequeño, consideramos que las conformaciones de una preproteína en translocación corresponden a las de un polímero en translocación.

Los tres tiempos dependen de parámetros asociados al sistema de translocación. En nuestros modelos, el tiempo de translocación  $\tau$  se calcula mediante la ecuación 4.17, para ello, se necesita el coeficiente de difusión de la cadena durante el transporte, dado por la ecuación 5.12, y la energía libre de la cadena, dada por las ecuaciones 3.21 y 3.36. El tiempo característico  $\tau_o$  va como  $\tau_o \sim c_p^{-2/3}/D_o$  [35] y depende de la densidad en número  $c_p$  de las proteínas que abarrotan y de su coeficiente de difusión  $D_o$  en el citoplasma o en el lumen del RE (dado respectivamente por las ecuaciones 5.9 y 5.10). El tiempo de relajación  $\tau_r$  va como  $\tau_r \sim (b^3\eta/k_B T) N^2$  [35] y depende de la longitud de monómero  $b$  y de la viscosidad del medio  $\eta$  que experimenta la cadena. Adicionalmente, cada uno de los tiempos depende de las condiciones de abarrotamiento dadas por las fracciones de volumen  $\phi_{cit}$  y  $\phi_{RE}$  y de la longitud de la cadena  $N$ .

### 5.7.2. Definición de los regímenes dinámico y estático

Para considerar a una preproteína como un polímero, el tiempo de translocación  $\tau$  debe ser mucho más grande que el tiempo de relajación  $\tau_r$ , de tal manera que la preproteína acceda a todos sus posibles conformaciones. De esta manera, la translocación se modela usando teorías de cadenas continuas con la condición  $\tau_r \ll \tau$ . Esta condición se demuestra numéricamente, más adelante.

Gopinathan y Kim consideran la movilidad de los agentes abarrotantes en dos casos límite, definidos como regímenes estático y dinámico, basados en los tres tiempos característicos del sistema,  $\tau$ ,  $\tau_o$  y  $\tau_r$  [35]. Nosotros adaptamos su definición para una preproteína en translocación rodeada por proteínas que abarrotan el medio intracelular e identificamos el tipo de régimen.

De acuerdo a Gopinathan y Kim, el régimen estático se define como el caso en el cual el movimiento por difusión de las proteínas que abarrotan es muy lento comparado con el movimiento de la preproteína en translocación, de tal forma que las proteínas abarrotando parecen inmóviles para la preproteína en translocación. Esta condición del régimen estático se consigue cuando  $\tau \ll \tau_o$ . El régimen dinámico ocurre cuando el movimiento por difusión de las proteínas que abarrotan es muy rápido comparado con el movimiento de la preproteína en translocación. En términos de los tiempos del sistema, el régimen dinámico se consigue cuando  $\tau \ll \tau_o$ . Considerando las condiciones sobre la movilidad de las proteínas que abarrotan, y el tiempo de relajación de una preproteína necesario para utilizar teoría de polímeros, los regímenes dinámico y estático, definidos

por Gopinathan y Kim, se obtienen cuando [35]:

$$\text{dinámico: } \tau_o \ll \tau_r \ll \tau \quad (5.14)$$

$$\text{estático: } \tau_r \ll \tau \ll \tau_o. \quad (5.15)$$

Para indicar si un sistema abarrotado corresponde a un régimen dinámico o a un régimen estático, deben evaluarse las expresiones anteriores. A continuación, tomando en cuenta las propiedades físicas del medio intracelular (concentraciones de proteínas, coeficientes de difusión y viscosidad), realizamos el análisis para el citoplasma y después indicamos los resultados para el lumen del RE.

### 5.7.3. Abarrotamiento dinámico en el citoplasma

Para evaluar las condiciones que definen a los regímenes dinámico y estático para el citoplasma, primero calculamos los tiempos  $\tau$ ,  $\tau_o$  y  $\tau_r$ , y después los comparamos entre sí. El cálculo de los tiempos depende de las condiciones de abarrotamiento por proteínas, dadas por la densidad en número  $c_p$  y por la fracción de volumen  $\phi$ , así como también de la viscosidad del medio  $\eta$ . Estos valores se indican a continuación.

La concentración de proteínas  $c$  en el citoplasma, para diferentes células eucariotas, se ha reportado en un intervalo de 100–320 mg/ml [62, 48, 32, 11, 17], como se indicó en la sección 5.1. Con una densidad específica de las proteínas en el citoplasma de *E. coli* de  $\rho^* = 1.2$  ml/g [118], se determinó en la sección 5.1 que la fracción de volumen que ocupan las proteínas está en el intervalo 0.12–0.38. Los valores mínimo y máximo,  $\phi_{\text{cit}} = 0.12$  y  $\phi_{\text{cit}} = 0.38$ , son utilizados en los cálculos para establecer intervalos de tiempos.

La densidad en número  $c_p$  de las proteínas que abarrotan el citoplasma corresponde al número de proteínas en el citoplasma  $N_p$  por unidad de volumen  $V$ , esto es  $c_p = N_p/V$ . Con la definición de la concentración  $c$ , y con la masa de una proteína  $m_p$ , se obtiene la siguiente relación  $N_p/V = c/m_p$ ; sustituyendo en la densidad en número da  $c_p = c/m_p$ . Al escribir la masa de una proteína en términos de la densidad específica  $\rho^*$  y del volumen de una proteína  $V_p$ ,  $m_p = V_p/\rho^*$ , se obtiene  $c_p = c\rho^*/V_p$ . La cantidad  $c\rho^*$  representa la fracción de volumen  $\phi$ ; para el volumen  $V_p$ , asignamos el de una proteína globular con radio de giro  $R_g = b\sqrt{N}/6$ , que significa abarrotamiento por proteínas de una sola especie. De esta manera, la densidad en número de proteínas del citoplasma queda como  $c_p = \phi_{\text{cit}}/V_p$ , con  $V_p = \frac{4}{3}\pi R_g^3$ .

Para la difusión de las proteínas que abarrotan el citoplasma utilizamos el modelo de difusión dado por la ecuación 5.9, esto es  $D_{\text{cit}}(N_o, \phi_{\text{cit}})$ .  $N_o$  representa el número de monómeros de una proteína abarrotante, si consideramos a la proteína en translocación de la misma especie que las proteínas que abarrotan, entonces, el tamaño es el mismo,  $N_o = N$ , y el coeficiente de difusión para las proteínas abarrotantes del citoplasma queda  $D_o = D_{\text{cit}}(N, \phi_{\text{cit}})$ .

La viscosidad del citoplasma  $\eta$  es reportada en un amplio intervalo de valores. Desde unas cuantas veces la viscosidad del agua [78, 50, 97, 60, 79, 43], a decenas

o incluso cientos de veces el valor del agua [60, 22]; ver Tabla 5.6. Una gran parte de los valores reportados está en el intervalo de 1–10 mPa·s; por lo tanto, en nuestros cálculos, utilizamos el valor intermedio 5 mPa·s (cinco veces el valor del agua) y discutimos lo que sucede para valores de viscosidad mayores y menores.

Con la densidad en número  $c_p$ , el coeficiente de difusión  $D_o$  y la viscosidad  $\eta$ , procedemos al cálculo de los tiempos, tomando en cuenta el intervalo de valores de la fracción de volumen  $\phi_{cit}$ .

Para la condición de menor abarrotamiento en el citoplasma,  $\phi_{cit} = 0.12$  o  $c = 100$  mg/ml, encontramos que el tiempo característico de las proteínas abarrotantes va como  $\tau_o \sim 979 N^{1.5}$ ps, mientras que el tiempo de relajación para una preproteína en translocación va como  $\tau_r \sim 66 N^2$ ps. Para el tiempo  $\tau$  es necesario asignar valores a  $N$  ya que solo puede calcularse numéricamente. En la Tabla 5.7, se muestran los valores numéricos para  $\tau_o$ ,  $\tau_r$  y  $\tau$ , para diferentes valores fisiológicos de  $N$ . Al comparar en función del tamaño  $N$ , encontramos que  $\tau_o > \tau_r$  para cadenas cortas con tamaño menor a 222 monómeros, esto incluye a proteínas como la prepromelitina y ERp18; para cadenas de mayor longitud, incluyendo proteínas de tamaño promedio como Ero1p y proteínas más grandes como ApoB, se tiene que  $\tau_o \ll \tau_r$ . Este último resultado, que abarca a la mayoría de las cadenas que se transportan (de tamaño promedio y grandes), satisface una de las condiciones de la expresión 5.14 para considerar al citoplasma como un medio abarrotado en un régimen dinámico. Las otras condiciones del régimen dinámico involucran al tiempo de translocación  $\tau$ . Al comparar los tres tiempos dados en la Tabla 5.7, el tiempo de translocación resulta mayor al tiempo característico de las proteínas abarrotantes ( $\tau_o \ll \tau$ ) y al tiempo de relajación de la cadena ( $\tau_r \ll \tau$ ), para cualquier tamaño de cadena en translocación, con lo cual se satisfacen todas las condiciones de la expresión 5.14 del régimen dinámico. Por lo tanto, el citoplasma corresponde a un ambiente abarrotado por proteínas en un régimen dinámico para cadenas de tamaño promedio y cadenas más grandes.

En el resultado anterior, se utilizó la condición de abarrotamiento menor. Para condiciones de abarrotamiento mayores,  $\phi_{cit} > 0.12$  o  $c > 100$  mg/ml, al comparar los tiempos  $\tau$ ,  $\tau_o$  y  $\tau_r$ , se siguen cumpliendo las condiciones de la expresión 5.14 del régimen dinámico para cadenas de tamaño promedio y cadenas más grandes. Esto se observa de los datos de la Tabla 5.7, para la máxima fracción de volumen  $\phi_{cit} = 0.38$ , a la máxima concentración 320 mg/ml.

Los resultados anteriores, cuando la viscosidad es 5 mPa·s, indican que el citoplasma en el rango de concentraciones fisiológico se comporta como un régimen dinámico para las proteínas de tamaño promedio y proteínas grandes.

Si consideramos valores de viscosidad más grandes, el tiempo de relajación de la cadena  $\tau_r$  aumenta y resulta mayor al tiempo de relajación cuando la viscosidad es 5 mPa·s. Este incremento permite que el tiempo  $\tau_r$  sea mayor al tiempo característico de los agentes abarrotantes  $\tau_o$  para cadenas en un intervalo de tamaños más amplio, incluyendo proteínas de menor tamaño como ERp18, lo cual no sucedía con la viscosidad de 5 mPa·s. Por ejemplo, para una viscosidad de 10 mPa·s, se cumple la primer condición del régimen dinámico,  $\tau_o \ll \tau_r$ , para cadenas de cualquier tamaño. Al comparar el tiempo de relajación con el

**Tabla 5.7:** Tiempos del sistema de translocación para cadenas de diferente tamaño: tiempo característico de las proteínas que abarrotan  $\tau_o$ , tiempo de relajación de una preproteína  $\tau_r$  y tiempo de translocación en un régimen dinámico  $\tau$ .

Proteína	$N$	$\tau_o(\phi_{\text{cit}} = 0.12)$	$\tau_o(\phi_{\text{cit}} = 0.38)$	$\tau_r$	$\tau$
Prepromelitina	70	0.6 $\mu\text{s}$	0.8 $\mu\text{s}$	0.3 $\mu\text{s}$	17 $\mu\text{s}$
ERp18	157	1.9 $\mu\text{s}$	2.6 $\mu\text{s}$	1.6 $\mu\text{s}$	238 $\mu\text{s}$
Ero1p	560	13 $\mu\text{s}$	18 $\mu\text{s}$	21 $\mu\text{s}$	30 ms
—	1000	31 $\mu\text{s}$	42 $\mu\text{s}$	66 $\mu\text{s}$	430 ms
ApoB	4536	299 $\mu\text{s}$	401 $\mu\text{s}$	1345 $\mu\text{s}$	56 min

tiempo de translocación, resulta menor, cumpliendo la segunda condición del régimen dinámico,  $\tau_r \ll \tau$ , y por lo tanto, las condiciones de abarrotamiento corresponden a un régimen dinámico.

De los resultados anteriores, concluimos que el abarrotamiento fisiológico del citoplasma, para viscosidades mayores a la del agua en un orden de magnitud, define al citoplasma como un medio abarrotado en un régimen dinámico. Para viscosidades cercanas a 5 mPa·s, sólo proteínas de tamaño promedio y proteínas mayores experimentan translocación en un régimen dinámico.

Para valores de viscosidad más pequeños, por ejemplo, 2 mPa·s (el doble de la viscosidad del agua), el tiempo de relajación  $\tau_r$  es menor comparado con el tiempo de relajación  $\tau_r$  a 5 mPa·s. Debido a esta reducción, al comparar con el tamaño de cadena, el tiempo  $\tau_r$  resulta menor al tiempo de las proteínas que abarrotan  $\tau_o$  para cadenas que van desde las más pequeñas y hasta cadenas de tamaño promedio, esto es  $\tau_r < \tau_o$ ; sólo para las cadenas más grandes como ApoB ambos tiempos resultan similares,  $\tau_r \sim \tau_o$ . En este caso, se satisface una de las condiciones de la expresión 5.15 para considerar al citoplasma como un ambiente abarrotado en un régimen estático. Sin embargo, la segunda condición  $\tau \ll \tau_o$ , necesaria para un régimen estático (ver la expresión 5.15), no se satisface, ya que  $\tau_o$  resulta menor a  $\tau$ ,  $\tau_o \ll \tau$ . En este caso, debido al valor de viscosidad, el abarrotamiento del citoplasma no corresponde a un régimen estático ni a un régimen dinámico, y por lo tanto la translocación debe modelarse de otra forma.

Los valores reportados para la viscosidad del citoplasma se encuentran en intervalo de 1–1000 mPa·s, ver Tabla 5.6. Tomando como referencia  $\eta = 10$  mPa·s, el abarrotamiento del citoplasma se encuentra en un régimen dinámico para cualquier preproteína en translocación.

#### 5.7.4. Abarrotamiento dinámico en el lumen del RE

Para analizar el tipo de abarrotamiento para el lumen del RE, repetimos el análisis anterior realizado para el citoplasma. Como condiciones de abarrotamiento se utilizarán los valores mínimo y máximo de la fracción de volumen de las proteínas del lumen del RE,  $\phi_{\text{RE}} = 0.12$  y  $\phi_{\text{RE}} = 0.24$

Para la menor condición de abarrotamiento  $\phi_{\text{RE}} = 0.12$ , el tiempo característico de las proteínas que abarrotan va como  $\tau_o = 143 \text{ ps } N^2$ . El tiempo de relajación  $\tau_r$  solo puede expresarse en términos de la viscosidad, a falta de valores para la viscosidad del lumen del RE (como se indicó en la sección 5.6). Asumiendo que la menor difusión de las proteínas en el lumen del RE comparada con la del citoplasma, se debe a una viscosidad mayor [24, 52], entonces el tiempo de relajación para una preproteína en el lumen del RE es similar al tiempo de relajación en el citoplasma a altas viscosidades. Ese caso, analizado en el apartado anterior, corresponde a abarrotamiento por proteínas en un régimen dinámico. Por lo tanto, concluimos que el lumen del RE se encuentra abarrotado por proteínas en un régimen dinámico.

## 5.8. Recapitulación

En este capítulo se mencionaron las propiedades físicas del medio intracelular donde se translocan las preproteínas a través de la membrana del RE. La concentración y la fracción de volumen de las proteínas del citoplasma y del lumen del RE los definen como medios abarrotados por proteínas. En consecuencia, el coeficiente de difusión de las proteínas, que definen su movilidad, resultó menor a la difusión de proteínas en agua, dependiente del tamaño de la proteína y de la fracción de volumen de las proteínas que abarrotan el medio. Los coeficientes de difusión para el citoplasma y el lumen del RE se ajustaron como función del tamaño con el modelo de Zimm de difusión para polímeros, y como función de la fracción de volumen con una ley exponencial, similar a los ajustes realizados en datos experimentales de difusión en sistemas abarrotados artificiales. Adicionalmente, se construyó un modelo heurístico para el coeficiente de difusión de una preproteína en translocación, necesario para el cálculo de los tiempos de translocación. Mediante valores experimentales de la viscosidad del medio intracelular de diferentes células se indicó que el citoplasma es un medio más viscoso que el agua, y que la lenta difusión de proteínas en el lumen del RE, sugiere que este medio es más viscoso que el citoplasma. Tomando en cuenta todas estas propiedades físicas, para valores de viscosidad mayores a 5 mPa-s, al calcular y comparar los tiempos característicos del sistema de translocación, se mostró que el abarrotamiento por proteínas del citoplasma y del lumen del RE se encuentra en un régimen dinámico. Para viscosidades cercanas a la del agua (1 mPa-s), el abarrotamiento por proteínas no corresponde ni a un régimen dinámico ni a un régimen estático; en este caso, la translocación debe modelarse de otra manera. Para viscosidades del citoplasma y del lumen del RE mayores a 10 mPa-s, la translocación y la retrotranslocación sucede en un medio abarrotado por proteínas en un régimen dinámico. Basados en este resultado, en el siguiente capítulo comparamos las variables físicas de la translocación entre un sistema abarrotado dinámico y un sistema diluido.

## Capítulo 6

# Resultados: Variables físicas de la translocación y de la retrotranslocación

Para cuantificar el efecto estérico del abarrotamiento por proteínas sobre el transporte de preproteínas a través de la membrana del RE, utilizando los modelos estéricos de translocación de los capítulos 3 y 4, calculamos las siguientes variables físicas que caracterizan al transporte: energía libre, energía de activación, fuerza, y tiempo de translocación y de retrotranslocación, y comparamos los resultados de los sistemas abarrotados en el régimen dinámico y en el régimen estático con los resultados del sistema diluido.

Iniciamos la discusión de los resultados del sistema abarrotado en el régimen dinámico, porque este caso corresponde al medio intracelular abarrotado por proteínas. Aunque el régimen estático no corresponde al abarrotamiento intracelular, también analizamos este caso para cuantificar el efecto del abarrotamiento por agentes sin movimiento.

### 6.1. El sistema diluido y el régimen dinámico

#### 6.1.1. La energía libre y la energía de activación en un ambiente diluido

El sistema de referencia para la comparación es el sistema diluido. A continuación indicamos los resultados de la energía y la energía de activación para la translocación.

La energía libre  $\mathcal{F}$  depende del número de monómeros  $n$  que se translocan y del número de monómeros  $N$  que contiene la cadena en transporte, al cual, nos referiremos como *la longitud o tamaño de la cadena*.

Por medio de la ecuación 3.20, calculamos la energía libre de translocación en

el sistema diluido. Para ejemplificar el comportamiento de la energía, utilizamos la longitud de una proteína de tamaño promedio como Ero1p de  $N = 560$  (de masa molecular 65 kDa). En la Figura 6.1 se muestra la energía libre como función del número de monómeros  $n$  translocados, y se ha graficado  $\mathcal{F}(n) - \mathcal{F}(N - 1)$  para establecer el nivel cero de energía en  $n = N - 1$ .

La energía libre presenta dos mínimos de igual valor cuando toda la cadena se encuentra en el lado *cis* o en el lado *trans*, que corresponderán de ahora en adelante al citoplasma (cit) o al lumen del retículo endoplásmico (RE), respectivamente. Al inicio de la translocación, al aumentar el número de monómeros translocados se incrementó la energía libre debido a la reducción en conformaciones de la cadena. Durante esta etapa, el proceso es no favorable energéticamente. Justo cuando la mitad de la cadena se ha translocado, en  $n = N/2$ , se alcanza el máximo de energía. Al translocar más de la mitad de la cadena, la energía empieza a disminuir, alcanzando su mínimo de energía cuando toda la cadena se ha translocado. Para cadenas de diferente tamaño  $N$  se obtiene el mismo comportamiento en la energía libre.

En este sistema, la energía libre presenta una barrera que es simétrica; ver la gráfica en la Figura 6.1. La amplitud de la barrera de energía se define como la energía de activación  $E_a$ , y está dada como la diferencia entre el máximo de la energía y el mínimo de energía, tomando en cuenta la dirección del transporte. Para la cadena de tamaño promedio Ero1p, la energía de activación para translocación es 1.52 kcal/mol. En este sistema diluido, ambos medios alrededor de la membrana son iguales y por lo tanto, la energía de activación de translocación es igual a la energía de activación de retrotranslocación.

Como función del tamaño de la cadena  $N$ , la energía de activación crece con la longitud de acuerdo a  $E_a = \frac{1}{2}k_B T \ln N/4$ . En la Figura 6.2 se muestra la energía de activación como función de  $N$  en el intervalo de tamaño que corresponde a las proteínas transportadas entre el citoplasma y el lumen del retículo endoplásmico. Note que la energía de activación va desde 0.9 kcal/mol para las preproteínas más pequeñas y hasta 2.2 kcal/mol para las proteínas más grandes, ver Tabla 6.1.

### 6.1.2. La energía libre y la energía de activación en un ambiente abarrotado dinámico

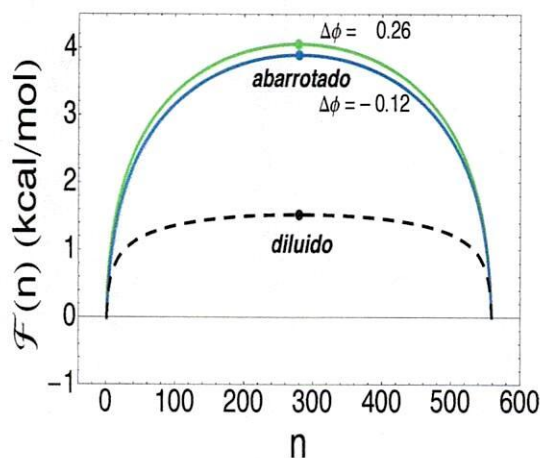
La energía libre  $\mathcal{F}$  de translocación en un sistema abarrotado, además del número de monómeros translocados  $n$  y del tamaño de la cadena  $N$ , depende de la fracción de ocupación  $\phi$  de los agentes abarrotantes en los lados *cis* y *trans* alrededor de la membrana. En nuestro caso, las fracciones de ocupación utilizadas corresponden a la del citoplasma  $\phi_{\text{cit}}$  y a la del lumen del RE  $\phi_{\text{RE}}$  especificadas en la Sección 5.1.

Para calcular la energía libre en el régimen dinámico, hemos utilizado la ecuación 3.36. Nosotros calculamos la energía libre para todos los valores de la fracción de ocupación en el citoplasma  $\phi_{\text{cit}}$  y en el lumen del RE  $\phi_{\text{RE}}$ . Por simplicidad, indicamos los resultados para la energía libre por medio de las diferencias entre las fracciones de ocupación, esto es, a través de  $\Delta\phi = \phi_{\text{cit}} - \phi_{\text{RE}}$ .

El valor mínimo que puede tomar esta diferencia de ocupaciones es  $-0.12$  y se obtiene cuando  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.12, 0.24)$ ; el valor máximo es  $0.26$  y se obtiene cuando  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.38, 0.12)$ . De esta manera, las diferencias de ocupación  $\Delta\phi$  están delimitadas por  $-0.12 \leq \Delta\phi \leq 0.26$ . Con esta notación, discutimos primero la translocación y después la retrotranslocación.

### La energía libre dinámica para diferentes condiciones de abarrotamiento

En la Figura 6.1, se muestra la energía libre de translocación para una cadena de tamaño promedio como Ero1p ( $N=560$ ) para las diferencias de ocupación mínima ( $\Delta\phi = -0.12$ ) y máxima ( $\Delta\phi = 0.26$ ), la energía libre para cualesquiera otras condiciones de abarrotamiento queda delimitada por esas dos curvas. Las dos curvas con abarrotamiento están muy cercanas entre sí, incluso cuando se han elegido las dos condiciones de abarrotamiento que corresponden a las mayores diferencias entre las fracciones de ocupación. Los valores de energía libre que se obtienen para  $\Delta\phi = -0.12$  y  $\Delta\phi = 0.26$  difieren en no más de  $0.2$  kcal/mol. Cuando se consideran cadenas de diferente tamaño, la curva de la energía libre tiene la misma forma que la energía libre de Ero1p.



**Figura 6.1:** Energía de activación en un ambiente abarrotado dinámico para una cadena promedio como Ero1p de  $N = 560$  monómeros. Las condiciones de abarrotamiento corresponden a:  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.12, 0.24)$  línea azul y  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.38, 0.12)$  línea verde. La línea a trozos corresponde a la energía libre en un ambiente diluido.

### La barrera de energía y la energía de activación

Por abarrotamiento dinámico, la energía libre presenta una barrera como sucede en el caso diluido, ver Figura 6.1. Cuando las fracciones de ocupación en

ambos lados de la membrana son iguales,  $\Delta\phi = 0.00$ , la barrera de energía es simétrica en  $n = N/2$ . Si las fracciones de ocupación son diferentes,  $\Delta\phi \neq 0.00$ , la barrera se desplaza en no más de un 1% respecto de  $n = N/2$ . Aunque la barrera puede considerarse como simétrica, la principal diferencia respecto del caso diluido es su mayor magnitud; esto tiene por resultado una mayor energía de activación  $E_a$ .

La energía de activación de translocación disminuye al aumentar la diferencia de ocupaciones  $\Delta\phi$ ; este comportamiento se ilustra en la Figura 6.2, en donde la región de color indica la energía de activación para las diferentes condiciones de abarrotamiento ( $\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{ER}}$ ). Adicionalmente, con una flecha se indica la dirección de crecimiento de  $\Delta\phi$ . Para Ero1p, la mínima energía de activación, 3.89 kcal/mol, se obtiene para la mayor diferencia de ocupación ( $\Delta\phi = 0.26$ ). La máxima energía de activación, 3.91 kcal/mol, se obtiene para la menor diferencia de ocupación ( $\Delta\phi = -0.12$ ). Para cualesquiera otras condiciones de abarrotamiento, la energía de activación queda entre esos dos valores. Las energías de activación mínima y máxima resultan iguales a 3.9 kcal/mol si solo se toman en cuenta las dos primeras cifras significativas, esto significa que las diferencias de ocupación no cambian significativamente la energía de activación. Este pequeño cambio en la energía de activación al modificar las condiciones de abarrotamiento ( $\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{ER}}$ ) se mantiene para cadenas de diferente tamaño, como puede observarse de los datos de la Tabla 6.1 y de las gráficas de la energía de activación para translocación y retrotranslocación en la Figura 6.2. En la Tabla 6.1, se indica la energía de activación para la translocación y la retrotranslocación de preproteínas en el intervalo de tamaños fisiológico, a las condiciones máxima y mínima de abarrotamiento.

**Tabla 6.1:** Energía de activación de translocación y de retrotranslocación para cadenas de diferente tamaño  $N$ . La energía de activación en un sistema diluido es  $E_a^{\text{dil}}$  y la energía de activación en un sistema abarrotado dinámico es  $E_a^{\text{din}}$ .

Análogo	$N$	$E_a^{\text{dil}}$ (kcal/mol)	$E_a^{\text{din}}(\Delta\phi)$ (kcal/mol)			
			Translocación		Retrotranslocación	
			$\Delta\phi$		$\Delta\phi$	
			-0.12	0.26	-0.12	0.26
Prepromelitina	70	0.89	1.46	1.44	1.44	1.54
ERp18	157	1.13	2.22	2.20	2.20	2.32
Ero1p	560	1.52	3.91	3.89	3.90	4.06
—	1000	1.70	4.96	4.93	4.94	5.12
ApoB	4536	2.17	8.86	8.82	8.84	9.03

Para cadenas de diferente longitud  $N$ , la energía de activación crece más rápido que  $\ln N$ , ley de crecimiento del caso diluido. En la Figura 6.2, se muestra la energía de activación como función del tamaño  $N$  para el sistema abarrotado

do dinámico, en donde se ha incluido la energía de activación del caso diluido por comparación. Para Ero1p, la energía de activación 3.9 kcal/mol equivale a 2.6 veces la energía de activación en el sistema diluido. Para cadenas realmente grandes como ApoB de tamaño  $N = 4536$ , la energía de activación 8.8 kcal/mol equivale a cuatro veces la energía de activación del caso diluido. El abarrotamiento dinámico aumenta la energía de activación con la longitud de la cadena. En cuanto a energía, el abarrotamiento dinámico afecta principalmente a las cadenas grandes. Para el sistema biológico de translocación, significa que debe proveer más energía para las cadenas más grandes a fin de sobrepasar la barrera de energía que impone el abarrotamiento dinámico, para conseguir la translocación.

La energía de activación también da un indicio del efecto del abarrotamiento dinámico sobre el tiempo de translocación (calculado como el tiempo promedio de primer paso). El orden de magnitud del tiempo de translocación se obtiene del factor de Arrhenius, dado por  $\exp(E_a/k_B T)$ . Para cadenas grandes como ApoB, utilizando la energía de activación de la Tabla 6.1 y  $T = 37^\circ\text{C}$ , el factor de Arrhenius es  $2 \times 10^6$  en un ambiente abarrotado dinámico y 33 en un sistema diluido. Esta gran diferencia en los factores de Arrhenius sugiere una diferencia similar en los tiempos de translocación.

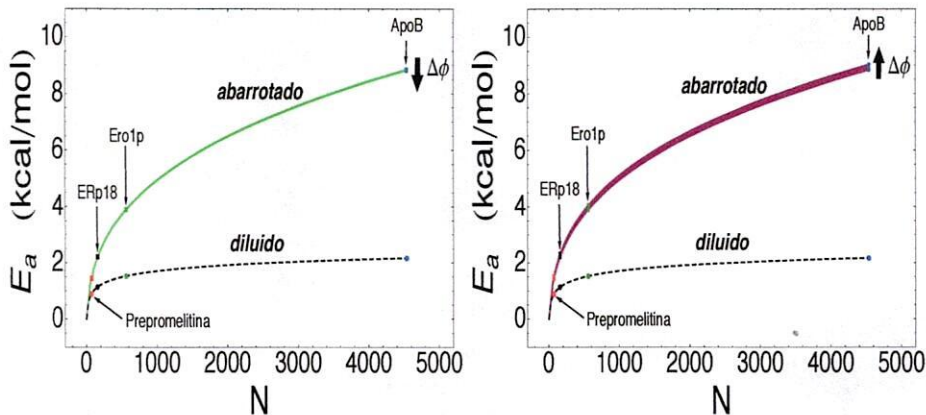
### El análisis energético para el proceso de retrotranslocación

Los resultados de la energía para la retrotranslocación en un ambiente abarrotado dinámico son similares a los resultados de la translocación. La energía libre de retrotranslocación también presenta una barrera de energía que puede considerarse simétrica en  $n = N/2$ , porque diferentes condiciones de abarrotamiento en ambos lados de la membrana no desplazan significativamente la posición de la barrera. Diferentes condiciones de abarrotamiento ( $\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{ER}}$ ) dan por resultado valores similares para la energía libre, que a su vez son similares a los de la translocación.

Para la energía de activación, encontramos que al aumentar la diferencia de ocupación  $\Delta\phi$  se incrementa la energía de activación. En la Figura 6.2, se ha graficado la energía de activación de retrotranslocación como función de la diferencia de ocupación  $\Delta\phi$  y del tamaño de la cadena  $N$ . En dicha Figura, la flecha indica la dirección de crecimiento de las diferencias de ocupación  $\Delta\phi$ 's. Para una cadena promedio como Ero1p, la energía de activación mínima de retrotranslocación, que se obtiene cuando  $\Delta\phi = -0.12$ , es 3.90 kcal/mol, y la energía de activación máxima, en  $\Delta\phi = 0.26$ , es 4.06 kcal/mol. En este caso, retrotranslocación, diferentes fracciones de ocupación generan cambios en la energía de activación que son más notorios comparados con el caso de translocación. Sin embargo, estos cambios en la energía siguen siendo pequeños incluso para cadenas de diferente tamaño, como puede observarse de los datos de la Tabla 6.1. Para las condiciones de abarrotamiento en las que la fracción de ocupación del citoplasma  $\phi_{\text{cit}}$  es mayor que la del lumen  $\phi_{\text{ER}}$  del ER, la energía de activación de retrotranslocación es mayor a la de translocación. Para la mayor diferencia de ocupación  $\Delta\phi = 0.26$ , la energía de activación de retrotranslocación es mayor a

la de translocación en apenas un 2% (ver las energías de activación de la Tabla 6.1 para diferentes cadenas).

Para el sistema de biológico, el costo energético de retrotranslocación por abarrotamiento dinámico es igual al de translocación o mayor pero en no más de un 2%.



**Figura 6.2:** Energía de activación en el régimen dinámico como función de  $N$ . Las regiones en color indican la energía de activación para diferentes condiciones de abarrotamiento ( $\phi_{cit}$ ,  $\phi_{RE}$ ). Las flechas indican el cambio en la energía de activación al aumentar la diferencia de ocupación  $\Delta\phi$ . La línea a trozos representa la energía de activación en el sistema diluido. Adicionalmente, con puntos de color se muestra la energía de activación para cadenas de diferente tamaño translocadas en células eucariotas. Izquierda: translocación; derecha: retrotranslocación.

### Comparación de la energía con valores reportados en la literatura

Alder y Theg indican que la energía libre de la hidrólisis<sup>1</sup> de ATP es de 60 kJ/mol  $\approx$  14 kcal/mol bajo condiciones celulares [2]. En las células, casi todos los sistemas de translocación utilizan la energía libre de la hidrólisis de ATP, entre otras [2]. De nuestros resultados, la energía de activación en el sistema diluido va desde 0.9 hasta 2.2 kcal/mol, desde las proteínas más pequeñas y hasta las proteínas más grandes. Por abarrotamiento dinámico, la energía de activación va desde 1.4 hasta 8.9 kcal/mol para el mismo intervalo de proteínas. Comparando con la energía libre de la hidrólisis de ATP, la energía de activación en el sistema diluido equivale a un 6% y hasta un 16% mientras que en el sistema abarrotado dinámico equivale a un 10% y hasta un 64%. Estos resultados indican que un sistema abarrotado dinámico requerirá consumir una mayor

<sup>1</sup>La energía útil en una molécula de ATP está contenida en sus enlaces fosfoanhidridos. Una molécula tiene dos enlaces fosfoanhidridos. La energía de la hidrólisis de cada enlace fosfoanhidrido es 7.3 kcal/mol [53].

cantidad de ATP para realizar la translocación, comparado con un ambiente diluido, ya sea que la translocación se lleve a cabo en un sistema construido o en el interior de las células.

La cantidad de ATP consumida durante la translocación de preproteínas no se conoce de forma precisa. En experimentos *in vitro* con vesículas de membrana invertida (VMI) [101], al comparar la cantidad de ATP consumido por cantidad de proteína translocada, se ha estimado que se hidrolizan cinco moléculas de ATP por cada aminoácido translocado, en un sistema que acopla de manera poco eficiente la hidrólisis de ATP. En experimentos adicionales en VMI, para proteínas de entre 200 y 550 aminoácidos, se indica que se necesitan de uno a dos ciclos de consumo de ATP para conseguir la translocación de una cadena [51]. Por falta de valores más precisos, hemos comparado nuestros resultados de la energía de activación sólo con la energía libre de la hidrólisis de ATP.

### 6.1.3. La fuerza por abarrotamiento dinámico

La fuerza representa otra forma de cuantificar la energía. Utilizando los modelos de translocación, definimos la fuerza  $f$  como la derivada de la energía libre a lo largo de la longitud de la cadena ( $L = bN$ ):

$$f(n) = -\frac{d\mathcal{F}}{dL} = -\frac{1}{b} \frac{d\mathcal{F}}{dn} \quad (6.1)$$

donde  $b$  representa la longitud de un monómero. Para cadenas en translocación, asignamos a  $b$  la distancia entre dos aminoácidos consecutivos a lo largo de la cadena: 3.79 Å; ver Sección 5.5. Esta es una fuerza de origen entrópico, por lo tanto, no representa la fuerza neta sobre una cadena en transporte. Esta fuerza representa la que fuerza que experimentaría un agente externo por llevar a la cadena a un estado en el cual  $n$  monómeros han sido translocados.

Primero mostramos los resultados de la fuerza para una cadena en translocación en un ambiente diluido y después en un ambiente abarrotado dinámico.

#### Fuerza de translocación en un ambiente diluido

La fuerza presenta un comportamiento que puede separarse en dos etapas. La primera etapa abarca desde el inicio del transporte hasta que la mitad de la cadena es transportada; en esta etapa la fuerza toma valores negativos y por lo tanto es opuesta al transporte. La segunda etapa abarca desde la mitad del transporte hasta el final cuando toda la cadena ha sido transportada; en esta etapa la fuerza toma valores positivos y por lo tanto favorece el transporte.

En la primera etapa, la fuerza inicial es negativa y crece al aumentar el número de monómeros translocados. Por ser negativa, la fuerza es de oposición. Esto se debe a la reducción del número de conformaciones, al principio, al aumentar el número de monómeros que atraviesan se reduce las conformaciones de la cadena por disminuir la longitud de la cadena a un lado de la membrana. Como función del número de monómeros translocados  $n$ , la fuerza parte de un mínimo negativo al inicio del transporte y crece hasta que se vuelve cero justo

cuando la mitad de la cadena ha sido translocada. Este valor mínimo negativo equivale a una fuerza máxima de oposición a la translocación. La fuerza, al inicio del transporte, presenta una alta tasa de variación<sup>2</sup>, al aumentar el número de monómeros translocados, la tasa de variación se reduce. Por la alta tasa de variación, la fuerza de oposición que presenta la cadena a la translocación se reduce considerablemente cuando unos pocos monómeros han sido translocados. La fuerza se anula cuando la cantidad de monómeros a ambos lados de la pared es la misma,  $n = N/2$ , debido a que los segmentos de cadena a ambos lados de la membrana presentan el mismo número de conformaciones.

En la segunda etapa, más de la mitad de los monómeros se han translocado. Ahora, la fuerza toma valores positivos y es creciente. Por ser positiva, la fuerza favorece la translocación. La fuerza crece partiendo de cero con una tasa de variación inicial pequeña, la cual aumenta al final del transporte. Al final, cuando solo unos pocos monómeros faltan por ser translocados, la fuerza de empuje crece considerablemente alcanzando su valor máximo cuando toda la cadena ha sido translocada. Las magnitudes de la fuerza mínima y máxima son iguales porque el sistema al inicio es equivalente al sistema al final del transporte.

Cadenas de diferente tamaño siguen el tipo de comportamiento que acabamos de escribir. En la Figura 6.3 mostramos la fuerza como función del número de monómeros translocados  $n$ , para cadenas como las translocadas a través de la membrana del retículo endoplasmático, desde pequeñas como la prepromelitina ( $N = 70$ ) y ERp18 ( $N = 157$ ), de tamaño promedio como Ero1p ( $N = 560$ ), hasta las más grandes como ApoB ( $N = 4536$ ). La tasa de variación de la fuerza depende de la longitud de la cadena. Al inicio del transporte, una cadena grande necesita translocar más monómeros que una cadena pequeña a fin de reducir considerablemente la fuerza de oposición a la translocación. En términos de la longitud total de la cadena, para una cadena grande se necesita translocar una fracción menor que para una cadena pequeña a fin de reducir la fuerza opositora considerablemente. Esta característica, al inicio del transporte, se puede observar de las gráficas de la Figura 6.3, donde se ha graficado la fuerza como función del porcentaje de monómeros translocados.

Numéricamente, en magnitud, la fuerza inicial para una cadena de tamaño promedio, como Ero1p, es 5.635 pN. Para cadenas de diferente tamaño, las fuerzas iniciales son muy parecidas, desde 5.564 pN para cadenas tan pequeñas como la prepromelitina de  $N = 70$  hasta 5.644 pN para cadenas muy grandes como ApoB de  $N = 4536$ . Estas magnitudes son las mismas para la fuerza al final de la translocación.

En el sistema diluido la translocación y la retrotranslocación son equivalente, por considerar ambos lados de la membrana iguales y por ser un ambiente diluido. De esta manera, el análisis anterior también funciona para la retrotranslocación.

---

<sup>2</sup>La tasa de variación mide el cambio de la variable dependiente  $y$  al cambiar la variable independiente  $x$  desde un valor inicial  $x_i$  hasta un valor final  $x_f$ , y está dada por:  $y(x_f) - y(x_i)$ .

## Fuerza de translocación en un sistema abarrotado dinámico

Primero discutimos los resultados cuando se considera el mismo grado de abarrotamiento en ambos lados de la membrana:  $\phi_{\text{cit}} = \phi_{\text{RE}} = 0.24$ , y después describimos los resultados cuando se tienen condiciones de abarrotamiento diferentes.

Para  $\phi_{\text{cit}} = \phi_{\text{RE}} = 0.24$ , los resultados de la fuerza son similares numéricamente y en comportamiento a los descritos en las dos etapas del caso diluido. En la primera etapa de la translocación, la fuerza es negativa y creciente, con un mínimo al principio del transporte. Una fuerza negativa significa una fuerza de oposición al transporte; el mínimo negativo significa una fuerza máxima de oposición. En la segunda etapa, la fuerza es creciente y positiva, con un máximo al final del transporte. La fuerza positiva favorece el transporte.

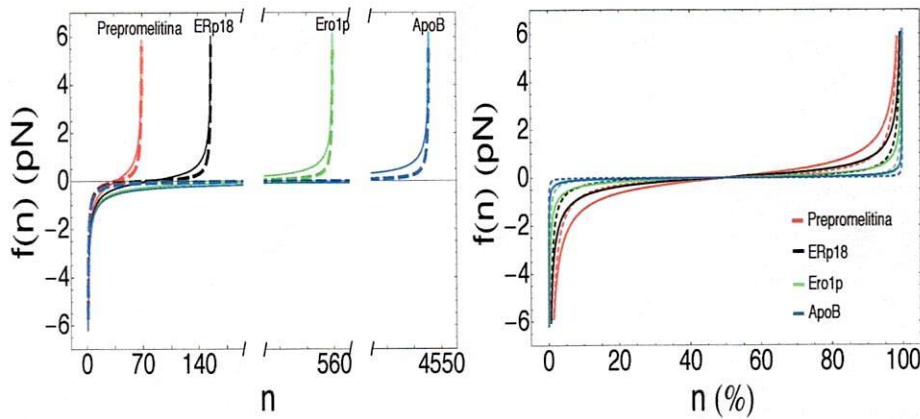
En la primera etapa, la fuerza aumenta al incrementarse el número de monómeros translocados con una tasa de cambio variable. Al principio, la tasa de variación es alta, y se reduce al aumentar el número de monómeros translocados. Una tasa de variación alta, implica que la fuerza de oposición se reduce considerablemente cuando se han translocado unos cuantos monómeros. Por ejemplo, para Ero1p de 560 monómeros, la fuerza inicial de oposición es 6.15 pN, después de translocar 14 monómeros, la fuerza de oposición se ha reducido considerablemente a menos 1 pN. Al comparar con el sistema diluido, la tasa de variación por abarrotamiento es menor; en el sistema diluido es suficiente translocar 6 monómeros para reducir la fuerza de oposición de 5.64 pN a menos de 1 pN, para Ero1p. Esta diferencia en la tasa de variación de la fuerza, debido al abarrotamiento dinámico, implica que el sistema biológico de translocación debe realizar más trabajo comparado con el que haría en un sistema diluido para realizar la translocación, al inicio del transporte.

Cuando la mitad de la cadena ha sido translocada, la fuerza se anula. Al aumentar el número de monómeros translocados, la fuerza continúa creciendo, pero ahora es positiva, lo cual favorece el transporte. En esta segunda etapa, la fuerza presenta una tasa de variación inicial pequeña, la cual aumenta considerablemente al final del transporte. Para una cadena como Ero1p, cuando faltan 14 monómeros por ser translocados, la fuerza de empuje es menor pero aproximadamente igual a 1 pN, al continuar la translocación la fuerza sigue creciendo alcanzando un máximo de 6.15 pN al final del transporte. Comparado con el sistema diluido, la fuerza de empuje es mayor en el caso abarrotado dinámico. Esto implica que al final del transporte, el sistema de translocación debe realizar menos trabajo en el sistema abarrotado dinámico comparado con el correspondiente en un sistema diluido.

La tasa de variación de la fuerza depende del tamaño de la cadena. En la Figura 6.3, se muestra la fuerza para diferentes cadenas. En la primera etapa del transporte donde la fuerza es negativa, la tasa de variación disminuye al aumentar la longitud de la cadena. Para cadenas grandes, la fuerza de oposición persiste más comparando con la fuerza de oposición para cadenas cortas, esto implica que el sistema de translocación debe realizar más trabajo para una cadena larga que para una cadena corta. En la etapa donde la fuerza es positiva,

la tasa de variación aumenta al aumentar la longitud de la cadena; esto implica que el sistema de translocación debe realizar menos trabajo para una cadena larga que para una cadena corta.

Para identificar la importancia de la fuerza durante el transporte, como función del tamaño de la cadena, graficamos la fuerza como función del porcentaje de monómeros translocados en la Figura 6.3. Para cadenas pequeñas, la fuerza persiste durante una mayor fracción de la cadena comparada con cadenas largas. Por ejemplo, la fracción translocada a la cual la fuerza se reduce a menos de 1 pN; para la cadena más corta, la prepromelitina, es del 9% mientras que para la cadena más larga, ApoB, es de apenas el 3%.



**Figura 6.3:** Fuerza de translocación para cadenas de tamaño  $N = 70, 157, 560$  y  $4536$ , que corresponde al número de monómeros de las proteínas prepromelitina, Erp18, Ero1p, y ApoB, respectivamente. Las líneas punteadas se refieren a la fuerza en un ambiente diluido y las líneas continuas a la fuerza en un sistema abarrotado dinámico bajo las condiciones de abarrotamiento  $\phi_{\text{cit}} = \phi_{\text{RE}} = 0.24$ . Izquierda: fuerza como función del número de monómeros translocados  $n$ ; derecha: fuerza como función del porcentaje de la cadena translocado.

Los valores mínimo y máximo de la fuerza, para  $\phi_{\text{cit}} = \phi_{\text{RE}} = 0.24$ , son iguales en magnitud. Estos valores no cambian significativamente con la longitud de la cadena. Para las cadenas más pequeñas translocadas a través del retículo endoplasmático, como la prepromelitina, la fuerza máxima es  $5.87$  pN mientras que para cadenas grandes, como ApoB, es de  $6.19$  pN. Estos valores corresponden a un incremento con respecto a la fuerza en el sistema diluido del 6% para una cadena la prepropmelitina y a un 10% para una cadena como ApoB.

Para diferentes condiciones de abarrotamiento, la fuerza cambia sin diferir significativamente de los valores obtenidos con  $\phi_{\text{cit}} = \phi_{\text{RE}} = 0.24$ . Con las condiciones de abarrotamiento  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.38, 0.12)$ , que equivale a la máxima diferencia de ocupaciones  $\Delta\phi = 0.26$ , la fuerza al inicio del transporte (en mag-

nitid) es: 5.80 pN para una cadena como la prepromelitina de  $N = 70$ , y 6.17 pN para la cadena más grande como ApoB de  $N = 4536$ . Para las mismas cadenas, con las condiciones de abarrotamiento  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.12, 0.24)$ , que dan la mínima diferencia de ocupaciones  $\Delta\phi = -0.12$ , los valores de fuerza inicial son 5.87 pN y 6.19 pN, respectivamente. Estos resultados indican que la fuerza crece (en magnitud) al aumentar la diferencia de ocupaciones. Comparando con las fuerzas en el sistema diluido, la fuerza inicial para una cadena como la prepromelitina (5.56 pN), aumenta desde un 4 % hasta un 6 % por abarrotamiento dinámico, mientras que la fuerza inicial para una cadena como ApoB (5.64 pN) aumenta desde un 9.4 % hasta un 9.7 %.

Cuando las condiciones de abarrotamiento son iguales a ambos lados de la membrana,  $\phi_{\text{cit}} = \phi_{\text{RE}} = 0.24$ , la fuerza se anula justo cuando la mitad de la fuerza ha sido translocada,  $n = N/2$ . Cuando las condiciones de abarrotamiento son diferentes, la fuerza se anula antes o después de  $n = N/2$ , en no más del 0.5 %, para cadenas de cualquier tamaño y bajo cualesquiera condiciones de abarrotamiento. Para fines prácticos, la fuerza se anula cuando la mitad de la cadena ha sido translocada.

### Fuerza de retrotranslocación en un sistema abarrotado dinámico

En retrotranslocación, una cadena se transporta en la dirección opuesta, del lumen del RE al citoplasma. Los resultados de la fuerza bajo abarrotamiento dinámico son similares a los de la fuerza en translocación. La fuerza es creciente, negativa al principio y hasta que la mitad de la cadena se ha translocado, después la fuerza es positiva. Por el abarrotamiento dinámico, la fuerza inicial para una cadena como la prepromelitina, crece entre un 4.5–16.2 % al aumentar la diferencia de ocupaciones; para una cadena grande como ApoB, crece entre un 9.2–12.2 %. En este caso, los incrementos en la fuerza son ligeramente mayores comparados con la fuerza en translocación cuando la concentración o fracción de agentes abarrotantes del citoplasma es mayor a la del lumen del RE. Estos valores indican que durante la retrotranslocación, el sistema de translocación debe realizar más trabajo que el correspondiente a la translocación, cuando la fracción de ocupación del citoplasma sea mayor que la fracción de ocupación en el lumen.

### Comparación de las fuerzas con datos reportados en la literatura

En el sistema biológico de translocación, existen complejos proteicos asociados al canal conductor de proteínas que asisten la translocación al proveer fuerza. En las bacterias, el complejo correspondiente es la proteína citosólica SecA ATP-asa. En las células eucariotas, la fuerza está asociada a la acción de la chaperona BiP perteneciente a la familia de las proteínas Hsp70, que opera semejando un trinquete molecular [74]. A nuestro saber, no existen resultados experimentales que cuantifiquen la fuerza generada por SecA o BiP durante la translocación. Estimaciones del valor de la fuerza para las proteínas asistentes han sido reportadas por Alder y Theg. Adicionalmente, con la ecuación de Mar-

den y Allen, se puede estimar la fuerza que ejercen dichas proteínas en términos de su masa. En este apartado, comparamos la fuerza que resulta de nuestros cálculos con las fuerzas estimadas por Alder y Theg, y con la fuerza predicha por la ecuación de Marden y Allen. Primero indicamos esas fuerzas y después realizamos la comparación.

Para estimar la fuerza, Alder y Theg consideraron que la energía liberada en la hidrólisis de ATP (60 kJ/mol  $\approx$  14 kcal/mol) es completamente transformada por SecA o una de las proteínas Hsp70 en energía de translocación [2]. Para bacterias, ellos estimaron que la chaperona asistente SecA provee una fuerza de 11 pN, mientras que para eucariotas, ellos estimaron una fuerza de 28 pN para proteínas de la familia Hsp70. Una fuerza similar, de entre 10–20 pN, fue calculada por De Los Rios *et al.* para la chaperona mtHsp70 en el sistema de translocación a través de la matriz mitocondrial [86].

Para obtener una relación entre la fuerza máxima  $f$  que ejerce un motor y su masa  $m$ , Marden y Allen estudiaron motores sintéticos y motores moleculares<sup>3</sup> de diferentes tipos y tamaños, y obtuvieron la relación [40, 59]:

$$f(m) = \left(26600 \frac{m}{\text{kg}}\right)^{2/3} \text{N} \quad (6.2)$$

la cual está expresada en Newtons (N). Con esta expresión estimamos la fuerza que ejercerían SecA y BiP durante la translocación, para ello, necesitamos su masa. Se sabe que SecA se pliega como una molécula homodimérica con masa por monómero de 102 kDa [28]. Si SecA operara como un dímero, entonces la fuerza máxima sería 4.32 pN. Sin embargo, análisis sobre la interacción entre SecA y el complejo de translocación SecY, sugieren que SecA pudiera operar como monómero [69, 115]. En este caso, la fuerza máxima calculada para SecA es 2.72 pN. Para BiP, con una masa de 78 kDa [66], la fuerza calculada es 2.28 pN. La fuerza calculada para SecA en su forma monomérica resulta muy parecida a la de BiP, por ello, uno esperaría que la dinámica del transporte entre ambos sistemas, eucariotas y bacterias, fuera similar. Estos valores de fuerza, en la escala de piconewtons, resultan menores a los estimados por Alder y Theg.

De acuerdo a nuestros cálculos para la translocación en un sistema diluido y en un sistema abarrotado dinámico, la fuerza cambia con el número de monómeros translocados. Como valor de referencia para hacer la comparación, tomamos el valor máximo de la fuerza, en magnitud, que se obtiene al principio de la translocación. Primero comparamos con la fuerza del sistema diluido.

En un sistema diluido, para una cadena de tamaño promedio como Ero1p, la fuerza máxima de translocación es 5.64 pN. Este valor, comparado con la fuerza de BiP para translocación en eucariotas, equivale a 0.2 veces la fuerza estimada por Alder y Theg, y a 2.5 veces la fuerza estimada utilizando la expresión de

<sup>3</sup>De acuerdo a Hess [40], los motores moleculares están formados por proteínas y son capaces de convertir energía química almacenada en moléculas individuales en trabajo mecánico. Una forma común de esta conversión se debe a cambios conformacionales generados en una molécula por la de adhesión y liberación de sustratos y productos durante los procesos de adhesión de ATP, hidrólisis, y liberación de ADP/fofosfato. Algunas moléculas que utilizan esta forma de operar son las miosinas y las quinesinas, así como las proteínas rotatorias ATP sintasas.

Marden y Allen (ecuación 6.2). Esa misma fuerza del sistema diluido, comparada con la fuerza de SecA para translocación en bacterias, equivale a 0.5 veces la fuerza estimada por Alder y Theg y a 2.1 veces la fuerza calculada con la expresión de Marden y Allen. En ambas comparaciones, la fuerza inicial de translocación en un sistema diluido resultó comparable a las fuerzas de SecA y BiP estimadas por Alder y Theg y utilizando la expresión de Marden y Allen. Esto significa que la pura contribución entrópica de la cadena es importante al nivel de fuerzas durante el transporte en un sistema biológico, ya sea, en una bacteria o en una célula eucariota.

De las dos estimaciones para las fuerzas de SecA y BiP, si consideramos que los cálculos obtenidos con la expresión de Marden y Allen son más precisos que los de Alder y Theg debido a que relacionan la fuerza de la proteína asistente (considerada como motor) con su masa, entonces de la comparación resulta que la fuerza entrópica de la cadena tiene mayor importancia en una célula eucariota que en una bacteria. La fuerza entrópica al inicio del transporte para Ero1p es 5.64 pN mientras que la fuerza que ejercería BiP sería 2.28 pN y la fuerza de SecA sería 2.72 pN.

De nuestros cálculos de las fuerzas de translocación en un sistema diluido y en un sistema abarrotado dinámico, encontramos que las fuerzas son similares en magnitud. Por lo tanto, los resultados de la comparación entre las fuerzas del sistema abarrotado dinámico con las fuerzas estimadas para SecA y BiP son similares a los discutidos para el sistema diluido en los párrafos anteriores.

#### 6.1.4. Tiempo de translocación en un ambiente abarrotado dinámico

El tiempo promedio de translocación o de retrotranslocación lo definimos como el tiempo promedio de primer paso, el cual puede calcularse utilizando la ecuación 4.17. En esta sección, primero mostramos los resultados para el tiempo de translocación en un sistema diluido y después los resultados para translocación y la retrotranslocación en un sistema abarrotado dinámico. Para finalizar, comparamos nuestros cálculos con datos disponibles en la literatura.

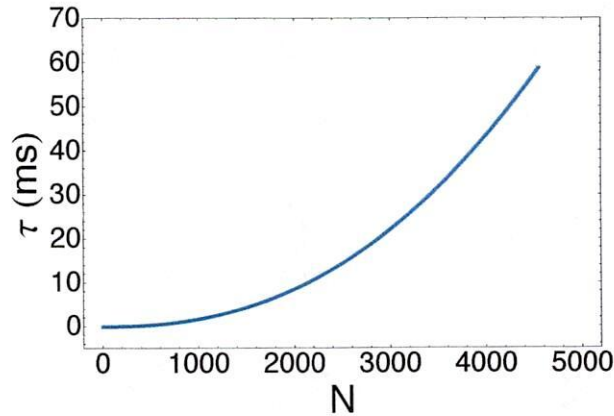
##### Tiempo de translocación en un ambiente diluido

Para calcular el tiempo de primer paso en un sistema diluido, el cual definimos como el tiempo promedio de translocación  $\tau_{\text{dil}}$ , utilizamos la ecuación 4.17.

El tiempo de translocación crece al aumentar el tamaño de la cadena  $N$ , de acuerdo a  $\tau = 155 \text{ ps} N^{2.34} \sim N^{2+p}$ , donde  $p$  representa el exponente de  $N$  en el modelo de Zimm para la difusión de un polímero [26]. En este caso,  $p = 1/3$  es el exponente que se obtiene al ajustar el coeficiente de difusión de proteínas en agua (ver Sección 5.2). Este resultado está de acuerdo con el resultado de Sung y Park para el tiempo de translocación:  $\tau \sim N^{2+p}$  [96].

En la Figura 6.4, se muestra el tiempo de translocación. Para cadenas cuyos tamaños corresponden a los de proteínas transportadas en los sistemas biológicos

( $N = 70 - 4536$ ), el tiempo abarca desde microsegundos hasta milésimas de segundos. Para las cadenas más pequeñas, como la prepromelitina de  $N = 70$  o la preprocecropina A de  $N = 64$  [90] el tiempo de translocación es  $\approx 3 \mu\text{s}$ , mientras que para cadenas realmente grandes como ApoB de  $N = 4536$  el tiempo es 58 ms, ver Tabla 6.2.



**Figura 6.4:** Tiempo de translocación en un sistema diluido como función del tamaño de la cadena.

### El tiempo de translocación en un ambiente abarrotado dinámico

El tiempo de translocación es el tiempo promedio de primer paso de una cadena que parte del citoplasma y termina en el lumen del retículo endoplásmico. El tiempo de retrotranslocación es el tiempo promedio de primer paso para una cadena que empieza en el lumen del RE y termina en el citoplasma. En este trabajo utilizaremos la designación *tiempo de transporte* para referirnos indistintamente a cualquiera de los dos tiempos, de translocación o de retrotranslocación.

Para calcular el tiempo de transporte  $\tau$ , utilizamos la ecuación 4.17. El tiempo depende de la energía libre  $\mathcal{F}$  y del coeficiente de difusión  $D$  de la cadena en transporte, para el cálculo de  $\tau$  utilizamos las expresiones discutidas en la Sección 3.4 y en la Sección 5.3, respectivamente. Adicionalmente, el tiempo depende de las condiciones de abarrotamiento dadas por  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}})$  y del tamaño de la cadena en transporte  $N$ . Por lo tanto, primero discutimos los resultados del tiempo de transporte cuando se consideran diferentes condiciones de abarrotamiento y después como función de la longitud de la cadena.

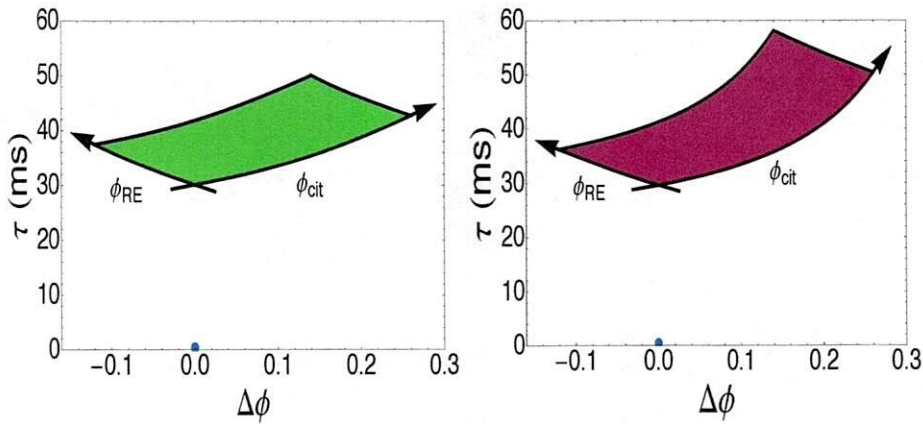
### Tiempo de transporte como función de $\phi_{\text{cit}}$ y $\phi_{\text{ER}}$

Para calcular el tiempo de translocación como función de las condiciones de abarrotamiento, utilizamos los valores de las fracciones de ocupación del

citoplasma  $\phi_{\text{cit}}$  y del lumen del RE  $\phi_{\text{RE}}$  dadas por las expresiones 5.1 y 5.2, en la Sección 5.1. En la Figura 6.5, se muestra el tiempo de transporte para una cadena de tamaño promedio como Ero1p de  $N = 560$ , como función de las diferencias de ocupación  $\Delta\phi = \phi_{\text{cit}} - \phi_{\text{RE}}$ . En la Figura, cada punto de la región a color corresponde al tiempo  $\tau$  para un par de valores  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}})$ . Cuando se fija la fracción de ocupación del lumen del RE ( $\phi_{\text{RE}} = \text{cte.}$ ), el tiempo de translocación crece al aumentar la fracción de ocupación del citoplasma  $\phi_{\text{cit}}$ . Cuando se fija la fracción de ocupación del citoplasma ( $\phi_{\text{cit}} = \text{cte.}$ ), el tiempo de translocación crece al aumentar la fracción de ocupación del lumen  $\phi_{\text{RE}}$ . En la Figura 6.5, las flechas indican el cambio en el tiempo al aumentar la fracción de ocupación,  $\phi_{\text{cit}}$  o  $\phi_{\text{RE}}$ . El tiempo mínimo de translocación se obtiene para las mínimas condiciones de abarrotamiento  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.12, 0.12)$ , cuando  $\Delta\phi = 0.00$ . El tiempo máximo de translocación se obtiene para las condiciones máximas de abarrotamiento  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.38, 0.26)$ , cuando  $\Delta\phi = 0.14$ . El tiempo para cualquier otra condición de abarrotamiento queda delimitado por el tiempo mínimo y el tiempo máximo. Para Ero1p, el tiempo de translocación está en el intervalo de 30–50 ms, ver Figura 6.5.

En la Figura 6.5, se muestran los tiempos de la retrotranslocación para Ero1p. En la Figura, cada punto de la región a color corresponde al tiempo  $\tau$  para un par de valores  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}})$ . Cuando se fija la fracción de ocupación en el lumen ( $\phi_{\text{RE}} = \text{cte}$ ) el tiempo crece al aumentar la fracción de ocupación en el citoplasma  $\phi_{\text{cit}}$ . Cuando se fija la fracción de ocupación en el citoplasma ( $\phi_{\text{cit}} = \text{cte}$ ) el tiempo crece al aumentar la fracción de ocupación en el lumen  $\phi_{\text{RE}}$ . Este último resultado, que pareciera contraintuitivo (el tiempo aumenta al aumentar la fracción de ocupación de obstáculos en la región de salida), se debe a la dependencia del coeficiente de difusión en la fracción de ocupación. Al aumentar el grado de abarrotamiento en el lumen  $\phi_{\text{RE}}$  la difusividad de la cadena en el lumen disminuye, y por lo tanto, el tiempo de retrotranslocación aumenta. Los tiempos mínimo y máximo de retrotranslocación se obtienen para las condiciones de abarrotamiento mínima  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.12, 0.12)$  y máxima  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.24, 0.38)$ , respectivamente. Para Ero1p, el tiempo de retrotranslocación queda delimitado en el intervalo de 30–58 ms, como se aprecia en la Figura 6.5. En la Figura las flechas indican el cambio en el tiempo cuando aumenta la fracción de ocupación,  $\phi_{\text{cit}}$  o  $\phi_{\text{RE}}$ .

Al comparar los tiempos de translocación y de retrotranslocación de Ero1p, observamos que los tiempos mínimos son iguales, 30 ms; sin embargo, los tiempos máximos, 50 ms y 58 ms, difieren en un 14 %, al ser mayores los de retrotranslocación. Esto indica que, para altas concentraciones de proteínas en el medio intracelular, una proteína tarda más tiempo en ser retrotranslocada que en ser translocada. Esta diferencia entre el tiempo de translocación y el de retrotranslocación para altas concentraciones (o altas fracciones de ocupación) aumenta con el tamaño de la cadena  $N$ , ver Tabla 6.2. Para una de las proteínas más pequeñas, la prepromelitina, la diferencia es del 11 %, y para una de las proteínas más grandes, ApoB ( $N = 4536$ ), el tiempo de retrotranslocación (103 min) es un 29 % mayor que el de translocación (80 min). En la Tabla 6.2, se muestran los tiempos mínimos y máximos de translocación y de retrotranslocación, para



**Figura 6.5:** Tiempo de transporte como función de las condiciones de abarrotamiento para una cadena como Erolp de  $N = 560$ . Las flechas indican el cambio en el tiempo al aumentar las fracciones de ocupación  $\phi_{\text{cit}}$  y  $\phi_{\text{RE}}$ . El punto azul corresponde al tiempo en un ambiente diluido. Derecha: translocación; izquierda, retrotranslocación.

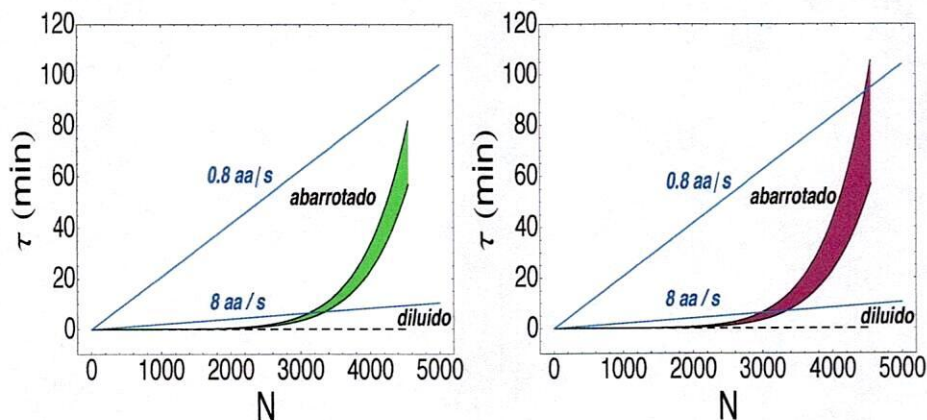
cadena de diferente tamaño. De la Tabla se puede observar que para altas concentraciones  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.24, 0.38)$  (lo cual equivale a  $\Delta\phi = 0.14$ ) el tiempo de retrotranslocación siempre es mayor que el tiempo de translocación.

**Tabla 6.2:** Tiempos de translocación y retrotranslocación en un sistema abarrotado dinámico  $\tau^{\text{din}}$  y en un sistema diluido  $\tau^{\text{dil}}$ .

Análogo	N	$\tau^{\text{dil}}$	$\tau^{\text{din}}(\Delta\phi)$			
			Translocación		Retrotranslocación	
			$\Delta\phi$		$\Delta\phi$	
			0.00	0.14	0.00	0.14
Prepromelitina	70	3.0 $\mu\text{s}$	17 $\mu\text{s}$	32 $\mu\text{s}$	16 $\mu\text{s}$	36 $\mu\text{s}$
ERp18	157	21 $\mu\text{s}$	238 $\mu\text{s}$	436 $\mu\text{s}$	228 $\mu\text{s}$	476 $\mu\text{s}$
Erolp	560	0.4 ms	30 ms	50 ms	30 ms	58 ms
—	1000	1.7 ms	430 ms	682 ms	426 ms	824 ms
ApoB	4536	58 ms	56 min	80 min	56 min	103 min

El tiempo de transporte crece al aumentar el tamaño de la cadena  $N$ . Para proteínas pequeñas como la prepromelitina, el tiempo de transporte es de unas decenas de microsegundos. Para cadenas grandes como ApoB, el tiempo de transporte está en el intervalo de una a dos horas (ver Tabla 6.2). En la Figura 6.6, se muestra el tiempo de transporte como función del tamaño de la cadena  $N$ . En la Figura, las regiones de color corresponden al tiempo de transporte

para las distintas condiciones de abarrotamiento del citoplasma  $\phi_{\text{cit}}$  y del lumen del RE  $\phi_{\text{RE}}$ . De las gráficas y de los valores de la Tabla 6.2, se puede ver que el intervalo del tiempo de retrotranslocación es más amplio que el intervalo del tiempo de translocación, principalmente para cadenas grandes.



**Figura 6.6:** Tiempo de transporte en un sistema abarrotado dinámico como función del tamaño. Las regiones en color corresponden al tiempo para las diferentes condiciones de abarrotamiento del citoplasma y del lumen del RE. La línea a trozos corresponde al tiempo de transporte en un sistema diluido. Las líneas azules corresponden al tiempo de translocación en ambientes diluidos, de acuerdo a datos experimentales. Derecha: translocación; izquierda, retrotranslocación.

Los tiempos de transporte por abarrotamiento dinámico son mayores a los tiempos de translocación en un ambiente diluido. Entre más grande sea la cadena mayor es la diferencia entre los tiempos. Por ejemplo, para una cadena pequeña como la prepromelitina, el tiempo de translocación por abarrotamiento dinámico es mayor al del sistema diluido de 6 a 11 veces, mientras que para una cadena como ApoB, el tiempo es mayor de  $6 \times 10^4$  a  $8 \times 10^4$  veces. En la Figura 6.5, con un punto azul se indica el tiempo de translocación en un sistema diluido; en la Figura 6.6 se incluye el tiempo de translocación en el ambiente diluido como función del tamaño, en dicha Figura (línea a trozos) el tiempo parece constante debido a la escala del eje vertical, propia del sistema abarrotado. Resultados similares se obtienen al comparar con los tiempos de retrotranslocación. Los resultados de la comparación, indican que el abarrotamiento dinámico ralentiza la translocación y la retrotranslocación, comparada con el transporte en un sistema diluido, y el efecto del abarrotamiento es mayor para cadenas largas.

## Velocidades de transporte y comparación con datos de la literatura

Trabajos experimentales *in vitro* diseñados para estudiar el transporte de proteínas en sistemas diluidos, han encontrado que la velocidad de translocación es del orden de unos cuantos aminoácidos por segundo (aa/s). Diferentes trabajos indican que la velocidad es independiente de la longitud de la cadena, con valores: entre 0.8–1.0 aa/s [31], 2.5 aa/s [101], y 8 aa/s [51].

Utilizando nuestros resultados del tiempo de transporte, calculamos la velocidad promedio de translocación  $v$  o tasa de translocación como la razón entre la longitud de la cadena  $N$  y el tiempo de transporte  $\tau$ :  $v = N/\tau$ . Para calcular la velocidad de cadenas de diferente longitud utilizamos los datos de la Tabla 6.2. En el sistema diluido, la velocidad de translocación para una cadena pequeña como la prepromelitina es  $2.3 \times 10^7$  aa/s mientras que para una cadena grande como ApoB es  $7.8 \times 10^4$  aa/s. En el sistema abarrotado dinámico, la máxima velocidad de translocación para la prepromelitina es  $4 \times 10^6$  aa/s mientras que para ApoB es 1.4 aa/s. De los dos sistemas, la velocidad de translocación para cadenas grandes en un sistema abarrotado dinámico resulta similar a las velocidades medidas experimentalmente en ambientes diluidos (de 0.8 a 8 aa/s), esto se indica en la Figura 6.6, donde se ha graficado el tiempo como función del tamaño  $N$ , utilizando las velocidades de translocación experimentales con  $\tau = N/v$ . La ralentización por abarrotamiento dinámico podría medirse experimentalmente en cadenas grandes, tomando en cuenta el amplio espectro de tamaños y de condiciones de abarrotamiento que permiten que el tiempo este en el intervalo de valores medibles experimentalmente, delimitado por las curvas azules en la Figura 6.6.

Las velocidades de translocación en un sistema diluido son varios ordenes de magnitud mayores a las experimentales. Esto indica que existen interacciones adicionales capaces de reducir considerablemente la velocidad de transporte, y que no se han considerado en el modelo. Lo mismo aplica para el sistema abarrotado, ya que las velocidades para cadenas cortas son mayores en varios ordenes de magnitud a las reportadas de experimentos en sistemas diluidos. Interacciones que pudieran ralentizar el transporte, son: *i*) interacciones entre monómeros que mantienen parcialmente plegado el segmento de cadena que aún no ha sido translocado, y/o *ii*) interacciones de la cadena con el canal de translocación. En el primer caso, un segmento de cadena parcialmente plegado necesita ser desnaturalizado antes de ser translocado [61], lo cual implica un costo energético y un tiempo de desnaturalización. Por ejemplo, la fuerza necesaria para desnaturalizar proteínas debido a sus diferentes dominios estructurales, está en el intervalo de 30–300 pN [20, 10], este tipo de fuerza no es despreciable comparada con las fuerzas estimadas para SecA o BiP. En el segundo caso, durante la translocación, el canal translocón embebido en la membrana debe ser abierto para permitir el paso de la cadena. Para diferentes membranas de fosfolípidos, la presión (lateral) de la membrana se ha calculado y estimado en el orden de MPa: 5–10 MPa [98], 30 MPa [15], 50 MPa [110], y 150 MPa [67]. Con estos valores de presión, el trabajo para abrir el canal (de longitud 5 nm) en un diámetro de 2 nm (el ancho aproximado de una hélice  $\alpha$ ) es de 10–340 kcal/mol (desde 5 hasta 150

MPa). Dicha cantidad no es despreciable para sistemas nanoscópicos.

Existen modelos de transporte, con interacciones adicionales que pueden acelerar el transporte. Uno de ellos es el modelo de Simon *et al.*, para una cadena con trinquetes que se mueve en una dimensión en un ambiente diluido [91]. En su modelo, los trinquetes actúan sobre el segmento de la cadena recién translocado en diferentes posiciones a lo largo del segmento. Al utilizar un coeficiente de difusión de  $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$  para una cadena de longitud 100 nm ( $N = 263$  aminoácidos), Simon *et al.* estimaron un tiempo de translocación de 5 ms cuando solo un trinquete actúa en el extremo de la cadena. Con múltiples trinquetes, actuando a 5 nm de distancia entre sí desde el extremo de la cadena (a cada 13 aminoácidos), el tiempo de translocación se reduce a 0.25 ms. Tomar en cuenta múltiples trinquetes, en su modelo, reduce el tiempo de translocación hasta 20 veces.

Para una cadena de la misma longitud (100 nm), nuestros cálculos indican un tiempo de transporte en el sistema diluido de 0.07 ms y en el sistema abarrotado dinámico de entre 1.5 a 2.6 ms (para  $\Delta\phi = 0.00$  y  $\Delta\phi = 0.26$ , respectivamente). Al comparar, el tiempo en el sistema diluido es 3.6 veces menor que el tiempo de Simon *et al.* con múltiples trinquetes, y el tiempo en el sistema abarrotado es de 2.4 a 3.3 veces menor que el tiempo con un solo trinquete. Nuestros cálculos de los tiempos resultan similares a los de Simon *et al.*. Con los resultados de Simon *et al.*, las velocidades de translocación son  $5 \times 10^4$  aa/s y  $1 \times 10^6$  aa/s, para uno y múltiples trinquetes, respectivamente. En el sistema diluido, la velocidad es de  $4 \times 10^6$  aa/s mientras que en el sistema abarrotado la velocidad es de  $1 \times 10^5$  aa/s a  $2 \times 10^5$  aa/s. Nuestras velocidades del sistema abarrotado están entre los valores de velocidad de Simon *et al.* para uno y múltiples trinquetes, mientras que la velocidad del sistema diluido es mayor que la velocidad con múltiples trinquetes.

Los cálculos de los tiempos y las velocidades en los modelos utilizados resultaron similares a los de Simon *et al.* para una cadena unidimensional con trinquetes. De acuerdo a los resultados de Simon *et al.*, al incluir trinquetes en el modelo se reduce el tiempo de translocación y por lo tanto se aumenta la velocidad. Los resultados de la comparación indican que modelos estéricos de translocación arrojan resultados similares. En consecuencia, además de las interacciones estéricas, deben incluirse en los modelos interacciones que ralenticen el transporte a fin de reproducir datos experimentales. Una propuesta es incluir el proceso de abertura del canal para permitir que la cadena se mueva libremente por difusión a través del canal. De acuerdo a uno de los modelos actuales para translocación en bacterias [51], una preproteína se difunde libremente cuando el canal se abre, este proceso está limitado por velocidades de reacción, lo cual genera lapsos de tiempo para que ocurra la abertura del canal. Estos lapsos de tiempo aumentarían el tiempo de translocación en nuestros modelos.

### 6.1.5. Tiempo de translocación en un ambiente de agentes abarrotantes de tamaño fijo

En la sección anterior discutimos el tiempo de translocación y retrotranslocación para una cadena de  $N$  monómeros que se transporta en un ambiente

abarroto por agentes de la misma especie, cuyo tamaño corresponde al radio de giro de una cadena en transporte:  $a = R_g(N)$ . Ahora discutimos los resultados para el tiempo de translocación considerando que una cadena de tamaño arbitrario se transporta en ambientes de agentes abarrotantes de tamaño fijo.

### Tamaño característico de los agentes abarrotantes del citoplasma

Para definir el tamaño fijo  $a$  para los agentes abarrotantes, utilizamos los tamaños de proteínas reportados por Zimmerman y Trach [118] para el citoplasma de *E. coli*. Zimmerman y Trach calcularon tamaños representativos para las macromoléculas (ARN y proteínas) al analizar extractos del citoplasma por medio de: 1) un arreglo de distribución de dos fases y 2) al usar la distribución de masas de las macromoléculas obtenidas por filtración en gel. En sus cálculos, Zimmerman y Trach consideraron a las proteínas y al ARN como dos especies formadas por esferas duras con interacción de volumen excluido. Los tamaños reportados para las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, respectivamente, son 3.06 y 3.52 nm (en el arreglo de distribución de dos fases), 3.17 y 3.51 nm (en filtración en gel); 2.88 y 3.30 nm (en el arreglo de distribución de dos fases), 3.10 y 3.43 nm (en filtración en gel). El promedio aritmético de los tamaños reportados, el cual utilizamos como tamaño fijo, es  $a = 3.25$  nm.

### El tiempo de translocación: misma especie en el citoplasma y en el lumen del RE

Consideramos a los agentes abarrotantes del citoplasma y del lumen del RE pertenecientes a la misma especie. En este caso, el tamaño de los agentes abarrotantes es el mismo en ambos lados de la membrana, esto es:  $a_{\text{cit}} = a_{\text{ER}} = a$ , y de acuerdo al párrafo anterior, el tamaño de los agentes es:  $a = 3.25$  nm. Con este valor calculamos el tiempo de translocación.

Al realizar el cálculo como función de tamaño de la cadena, el tiempo de translocación resulta similar numéricamente al tiempo de translocación cuando la especie que abarrota es del mismo tipo que la cadena en transporte. En la Tabla 6.3, se aprecia la similitud entre los tiempos al comparar los valores mínimos ( $\tau_{\text{mín}}$ ) y máximos ( $\tau_{\text{máx}}$ ). Note que los intervalos para el tiempo de translocación para cadenas pequeñas y hasta cadenas de tamaño promedio (desde la prepromelitina hasta Ero1p) son idénticos. Para cadenas largas, los intervalos de tiempo son ligeramente menores a los intervalos del caso en el cual los abarrotantes son del mismo tamaño que la cadena en transporte. Esta pequeña reducción se incrementa con el tamaño de la cadena, por ejemplo, para una cadena de 1000 monómeros, los tiempos mínimo y máximo se reducen apenas en un 0.5% y un 0.6%, respectivamente, mientras que para una cadena mayor como ApoB se reducen en un 29% y un 5%, respectivamente.

En la Figura 6.7, se muestra el tiempo de translocación para cadenas de diferente tamaño como función de la diferencia de ocupación  $\Delta\phi$ . Para cadenas cortas y hasta cadenas ligeramente largas  $N \sim 1000$ , el tiempo de translocación aumenta si se incrementa la concentración de agentes abarrotantes en un lado

**Tabla 6.3:** Tiempos de translocación en un sistema abarrotado dinámico  $\tau^{\text{din}}$ . Las columnas indican los tiempos de translocación mínimos ( $\tau_{\text{mín}}$ ) y máximos  $\tau_{\text{máx}}$  para cadenas de diferente tamaño cuando se considera abarrotamiento por agentes de tamaño fijo  $a = 3.25$  nm y abarrotamiento por agentes de la misma especie que se transloca de  $a = R_g(N)$ .

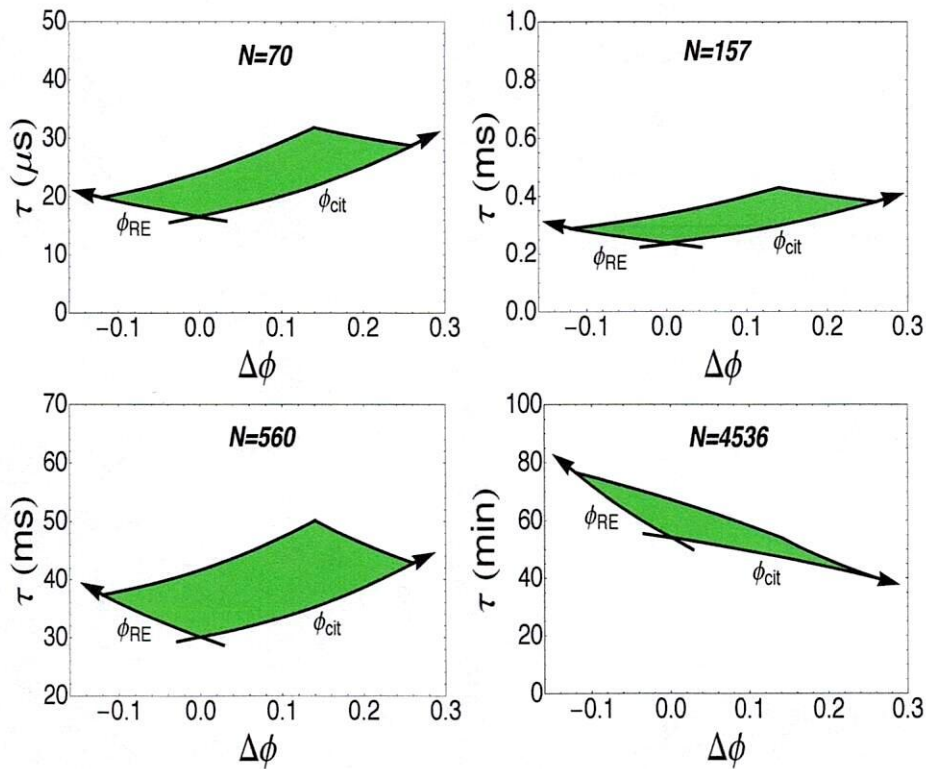
Análogo	N	$\tau^{\text{din}}(\Delta\phi)$			
		$a = 3.25$ nm		$a = R_g(N)$	
		$\tau_{\text{mín}}$	$\tau_{\text{máx}}$	$\tau_{\text{mín}}$	$\tau_{\text{máx}}$
Prepromelitina	70	17 $\mu\text{s}$	32 $\mu\text{s}$	17 $\mu\text{s}$	32 $\mu\text{s}$
ERp18	157	238 $\mu\text{s}$	430 $\mu\text{s}$	238 $\mu\text{s}$	436 $\mu\text{s}$
Ero1p	560	30 ms	50 ms	30 ms	50 ms
—	1000	428 ms	679 ms	430 ms	682 ms
ApoB	4536	40 min	76 min	56 min	80 min

de la membrana mientras la concentración se mantiene constante en el otro lado (ver Figura 6.7). Este resultado se debe a que la difusividad se impone a la parte energética de la cadena, como se discute posteriormente en la Sección 6.3. Este incremento en el tiempo de translocación también se obtuvo cuando se considero  $a = R_g$  en la sección anterior. Para cadenas de mayor tamaño como ApoB, el comportamiento en el tiempo de translocación es diferente. El tiempo disminuye al aumentar la concentración de agentes abarrotantes en el citoplasma manteniendo constante la del lumen del RE, mientras que aumenta con el incremento de la concentración del lumen manteniendo la del citoplasma constante (ver Figura 6.7). Esto significa que la contribución entrópica de la cadena facilita la translocación, y por lo tanto, se impone ante la contribución de la difusión de la cadena. Este comportamiento no se obtiene cuando  $a = R_g$ .

De los valores de la Tabla 6.3 y de las gráficas de la Figura 6.7, se concluye que las diferencias en el tiempo de translocación, entre el caso de agentes esféricos de tamaño fijo y el caso de agentes esféricos cuyo tamaño es el radio de giro de la cadena en transporte, se observa para cadenas grandes como ApoB. Las diferencias se observan por medio de: 1) la reducción en los intervalos del tiempo de translocación, y 2) la reducción en el tiempo de translocación al aumentar la concentración de abarrotantes del citoplasma, región donde se inicia el transporte, lo cual se debe a que la parte entrópica de la cadena (por medio de la energía libre) se impone a la difusión.

### El tiempo de translocación: especies diferentes en el citoplasma y en lumen del RE

Ahora consideramos el caso de dos especies diferentes con tamaño fijo, una en el citoplasma y la otra en el lumen del RE. Para la especie del citoplasma, consideramos al tamaño discutido anteriormente:  $a_{\text{cit}} = 3.25$  nm. Para la especie del lumen del RE, utilizamos como tamaño característico el radio de giro de



**Figura 6.7:** Tiempo de translocación en un ambiente abarrotado de agentes esféricos de tamaño fijo. Las graficas muestran el tiempo de translocación para las proteínas prepromelitina ( $N = 70$ ), ERp18 ( $N = 157$ ), Ero1p ( $N = 560$ ) y ApoB ( $N = 4536$ ), para  $\phi_{\text{cit}}$  y  $\phi_{\text{RE}}$  dentro de los valores fisiológicos.

una proteína luminal de tamaño promedio. Considerando a la chaperona BiP (de longitud  $N = 690$  [49]), el tamaño es  $a_{\text{RE}} = 4.10$  nm. Con estos valores, el tiempo de translocación para cadenas de diferente tamaño se muestra en la Tabla 6.4.

Al comparar el tiempo de translocación con el tiempo para el caso en que  $a = R_g$ , se encuentra, para cadenas pequeñas y hasta cadenas de tamaño promedio como Ero1p que el intervalo de tiempo es el mismo; ver Tabla 6.4. Para cadenas de mayor longitud, el intervalo de tiempo se reduce al aumentar el tamaño de la cadena. Por ejemplo, para una cadena de 1000 monómeros los tiempos mínimo y máximo se reducen en un 1.4% y un 1.5%, respectivamente, mientras que para una cadena más grande como ApoB, dichos tiempos se han reducido en un 32% y un 16%. Esta reducción del tiempo de translocación es mayor a la que se obtiene en el caso de una sola especie abarrotando ambos lados de la membrana. En cuanto al comportamiento del tiempo de translocación como función de la diferencia de ocupación  $\Delta\phi$ , los resultados son similares al caso de

**Tabla 6.4:** Tiempos de translocación en un sistema abarrotado dinámico  $\tau^{\text{din}}$ . Las columnas indican los tiempos mínimos ( $\tau_{\text{mín}}$ ) y máximos ( $\tau_{\text{máx}}$ ) para cadenas de diferente tamaño cuando existe abarrotamiento por especies de tamaño fijo en el citoplasma ( $a_{\text{cit}}$ ) y en el lumen del RE ( $a_{\text{RE}}$ ) y cuando existe abarrotamiento por agentes de la especie en translocación ( $a = R_g(N)$ ).

Análogo	N	$\tau^{\text{din}}(\Delta\phi)$			
		$a_{\text{cit}} = 3.25 \text{ nm}$ $a_{\text{RE}} = 4.10 \text{ nm}$		$a = R_g(N)$	
		$\tau_{\text{mín}}$	$\tau_{\text{máx}}$	$\tau_{\text{mín}}$	$\tau_{\text{máx}}$
Prepromelitina	70	17 $\mu\text{s}$	32 $\mu\text{s}$	17 $\mu\text{s}$	32 $\mu\text{s}$
ERp18	157	238 $\mu\text{s}$	430 $\mu\text{s}$	238 $\mu\text{s}$	436 $\mu\text{s}$
Ero1p	560	30 ms	50 ms	30 ms	50 ms
—	1000	424 ms	672 ms	430 ms	682 ms
ApoB	4536	38 min	67 min	56 min	80 min

una sola especie de tamaño fijo, el cual fue discutido anteriormente e ilustrado en la Figura 6.7.

## 6.2. El régimen estático

El sistema abarrotado estático corresponde al caso cuando los agentes abarrotantes carecen de movimiento comparado con el movimiento de una preproteína en translocación. Aunque este tipo de abarrotamiento no corresponde al tipo de abarrotamiento en los sistemas biológicos durante la translocación (ver Sección 5.7), estudiamos las variables físicas de la translocación para cuantificar el efecto del abarrotamiento por agentes sin movimiento. Para ello repetimos los cálculos del sistema abarrotado dinámico.

### 6.2.1. La energía libre y la energía de activación en el régimen estático

Para calcular la energía libre en el régimen estático  $\mathcal{F}(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}, n, N)$ , utilizamos la ecuación 3.21. Las condiciones de abarrotamiento empleadas corresponden a las encontradas en el citoplasma ( $\phi_{\text{cit}}$ ) y en el lumen del retículo endoplásmico ( $\phi_{\text{ER}}$ ). Iniciamos el estudio con el caso de translocación para una cadena de tamaño promedio; para cadenas de diferente longitud los resultados son similares.

#### La energía libre como función de las condiciones de abarrotamiento

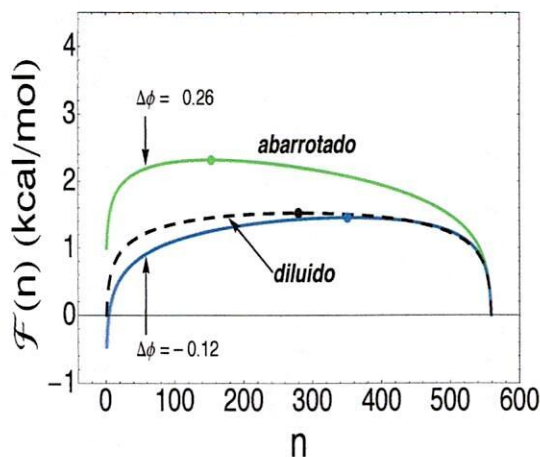
Para estudiar el efecto del abarrotamiento estático en la energía libre, utilizamos dos condiciones de abarrotamiento:  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{ER}}) = (0.12, 0.24)$  y  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{ER}}) =$

(0.38, 0.12), estas condiciones dan las diferencias de ocupación (entre el citoplasma y el lumen del RE) mínima ( $\Delta\phi = -0.12$ ) y máxima ( $\Delta\phi = 0.26$ ), respectivamente. En la Figura 6.8, se muestra la energía libre de translocación como función del número de monómeros translocados  $n$  para una cadena de tamaño promedio como Ero1p ( $N = 560$ ) bajo las condiciones de abarrotamiento indicadas. En la Figura también se muestra la energía en un sistema diluido. En la gráfica, el eje vertical representa  $\mathcal{F}(n) - \mathcal{F}(N - 1)$ , lo cual define al cero de energía como el estado en el cual toda la cadena ha sido translocada.

La energía libre presenta una barrera con dos mínimos que se obtienen al inicio ( $n = 1$ ) y al final ( $n = N - 1$ ) del transporte, cuando toda la cadena se encuentra en un solo lado. El valor de los mínimos de energía depende de las condiciones de abarrotamiento. La diferencia entre el mínimo de energía al final y el mínimo de energía al inicio, se utiliza para indicar si la translocación es favorable energéticamente. Al considerar todas las posibles condiciones de abarrotamiento, la diferencia de energía toma valores en el intervalo de  $-1.00$  kcal/mol a  $0.46$  kcal/mol, y estos valores se obtienen cuando  $\Delta\phi = 0.26$  con  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.38, 0.12)$  y cuando  $\Delta\phi = -0.12$  con  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.12, 0.24)$ , respectivamente. Esto se puede observar de la Figura 6.8 al comparar los valores inicial y final de la energía libre, para  $\Delta\phi = 0.26$  y  $\Delta\phi = -0.12$ . Cuando la diferencia entre los valores de energía final e inicial es negativa, la translocación es favorable energéticamente, ya que la cadena llega a un estado de mínima energía, si la diferencia es positiva la translocación no es favorable porque la cadena llega a un estado de máxima energía. La condición  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.38, 0.12)$  es la más favorable energéticamente, mientras que la condición  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.12, 0.24)$  es la menos favorable. Para cualesquiera otras condiciones de abarrotamiento, la diferencia entre los mínimos está delimitada por estos valores, de  $-1.00$  a  $0.46$  kcal/mol. La diferencia entre los mínimos de energía es cero cuando el grado de abarrotamiento es el mismo en ambos lados, para  $\Delta\phi = 0.00$ . La translocación resulta favorable cuando la concentración del citoplasma  $\phi_{\text{cit}}$  es mayor que del lumen del RE  $\phi_{\text{RE}}$ . Aunque existen condiciones de abarrotamiento que favorecen la translocación, es más importante el valor de la barrera de energía o energía de activación porque indica la energía mínima necesaria para que ocurra la translocación.

### La energía de activación en un sistema abarrotado estático

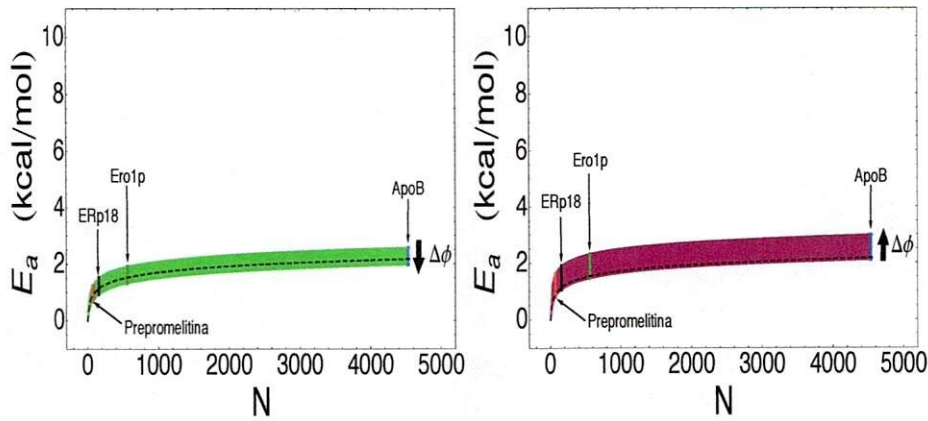
La energía de activación se obtiene de la diferencia entre el valor máximo de la energía libre y valor de la energía libre al inicio del transporte. En la Figura 6.8 el máximo de la energía libre se indica con un punto. Para una cadena en translocación de tamaño promedio como Ero1p, la energía de activación mínima es  $1.32$  kcal/mol para  $\Delta\phi = 0.26$  y la energía de activación máxima es  $1.92$  kcal/mol para  $\Delta\phi = -0.12$ . Para cualesquiera otras condiciones de abarrotamiento, la energía de activación cae en el intervalo de  $1.32$  a  $1.92$  kcal/mol. Los valores son similares a la energía de activación del sistema diluido,  $1.52$  kcal/mol, cuya gráfica de la energía libre también se muestra en la Figura 6.8. Por abarrotamiento estático la energía de activación puede ser menor, igual



**Figura 6.8:** Energía de activación en un ambiente abarrotado estático para una cadena promedio como Ero1p de  $N = 560$  monómeros. Las condiciones de abarrotamiento corresponden a:  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.12, 0.24)$  línea continua azul y  $(\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{RE}}) = (0.38, 0.12)$  línea continua verde. La línea a trozos corresponde a la energía libre en un ambiente diluido.

o mayor a la del sistema diluido. En el caso de retrotranslocación, la mínima energía de activación que se obtiene es 1.46 kcal/mol para  $\Delta\phi = -0.12$  y la máxima es 2.32 kcal/mol para  $\Delta\phi = 0.26$ , también en retrotranslocación la energía puede ser menor, igual o mayor a la del caso diluido. En translocación la energía de activación disminuye al incrementarse el valor de  $\Delta\phi$  mientras que en la retrotranslocación la energía de activación aumenta.

Para cadenas de diferente tamaño, la energía de activación es similar a la del sistema diluido. En la Tabla 6.5, se muestran las energías de activación para diferentes cadenas, para las condiciones que dan la mínima y máxima energía de activación. En translocación, la energía de activación para las cadenas pre-promelitina, ERp18, Ero1p y ApoB, se incrementa, comparado con el sistema diluido, en 1.4, 1.3, 1.3 y 1.2 veces para  $\Delta\phi = -0.12$  y disminuye en 0.8, 0.8, 0.9 y 0.9 veces para  $\Delta\phi = 0.26$ , respectivamente. Estos factores de cambio son menores comparados con el caso de abarrotamiento dinámico donde la energía se incrementa hasta en un factor de 4 para cadenas grandes. En cuanto a la dirección del transporte, para  $\Delta\phi = 0.26$ , la energía de activación de translocación es menor a la retrotranslocación en  $\approx 1.0$  kcal/mol, independientemente del tamaño de la cadena, sin embargo, para  $\Delta\phi = -0.12$  la energía de activación de translocación es mayor en 0.4 kcal/mol. En la Figura 6.9, la región en color indica el valor de la energía de activación por abarrotamiento estático para cadenas de diferente tamaño, en la Figura también se incluye la gráfica de la energía de activación del sistema diluido. En la Figura 6.9, las flechas indican el cambio en la energía de activación al aumentar  $\Delta\phi$ , al aumentar  $\Delta\phi$  la energía



**Figura 6.9:** Energía de activación en el régimen estático como función de  $N$ . Las regiones en color indican la energía de activación bajo condiciones de abarrotamiento fisiológico ( $\phi_{\text{cit}}, \phi_{\text{ER}}$ ). Las flechas indican el cambio en la energía de activación al aumentar la diferencia de ocupación  $\Delta\phi$ . La línea a trozos representa la energía de activación en el sistema diluido. Las barras en color indican la energía de activación para cadenas de diferente tamaño translocadas en células eucariotas. Izquierda: translocación; derecha: retrotranslocación.

de activación de translocación disminuye mientras que la de retrotranslocación aumenta. El cambio es el mismo para cadenas de diferente tamaño como se indica en la Figura para proteínas de interés fisiológico.

### 6.2.2. La fuerza en el régimen estático

La fuerza de translocación se calculó utilizando la ecuación 6.1. Primero mostramos los resultados considerando el mismo grado de abarrotamiento para el citoplasma y el lumen del RE ( $\phi_{\text{cit}} = \phi_{\text{RE}} = 0.24$ ) y después indicamos los resultados para otras condiciones de abarrotamiento.

Para  $\phi_{\text{cit}} = \phi_{\text{RE}} = 0.24$ , la fuerza por abarrotamiento estático es similar numéricamente a la fuerza del caso diluido, independientemente del tamaño de la cadena, como se muestra en la Figura 6.10. A diferencia del caso dinámico, la fuerza inicial (en magnitud) disminuye al aumentar el tamaño de la cadena. Para las cadenas prepromelitina, ERp18, Ero1p y ApoB la fuerza es 6.04, 5.95, 5.82 y 5.71 pN, respectivamente, estos valores son mayores a los correspondientes en el sistema diluido (5.56, 5.61, 5.64 y 5.64 pN) en un factor de 1.1, 1.1, 1.0 y 1.0 respectivamente. La fuerza como función del número de monómeros translocados  $n$ , por abarrotamiento estático, es muy similar a la fuerza en el caso diluido, por lo cual las curvas en la Figura 6.10 parecen estar superpuestas; esta superposición también se muestra para la fuerza como función de la fracción de monómeros translocados  $n(\%)$ . Al considerar diferentes condiciones de abarrotamiento, la fuerza inicial cambia ligeramente, por ejemplo, para la cadena más

**Tabla 6.5:** Energía de activación de translocación y de retrotranslocación para cadenas de diferente tamaño  $N$ . La energía de activación en un sistema diluido es  $E_a^{\text{dil}}$  y la energía de activación en un sistema abarrotado estático es  $E_a^{\text{est}}$ .

Análogo	$N$	$E_a^{\text{dil}}$ (kcal/mol)	$E_a^{\text{est}}(\Delta\phi)$ (kcal/mol)			
			Translocación		Retrotranslocación	
			$\Delta\phi$		$\Delta\phi$	
			-0.12	0.26	-0.12	0.26
Prepromelitina	70	0.89	1.24	0.68	0.81	1.62
ERp18	157	1.13	1.51	0.93	1.06	1.90
Ero1p	560	1.52	1.92	1.32	1.46	2.32
—	1000	1.70	2.10	1.50	1.64	2.51
ApoB	4536	2.17	2.60	1.97	2.11	2.99

pequeña  $N = 70$  la fuerza inicial es 5.10 pN para  $\Delta\phi = 0.26$  y cambia hasta 6.14 pN para  $\Delta\phi = -0.12$ , estos valores equivalen a un factor de 0.9 veces y 1.1 veces la fuerza inicial del caso diluido; para cadenas de mayor longitud el factor por el que cambia la fuerza inicial es mucho menor. La similitud entre las fuerzas en el ambiente diluido y en el ambiente abarrotado estático implica la misma similitud para el trabajo que realiza el sistema biológico durante la translocación, lo cual no ocurría en el caso de abarrotamiento dinámico. Para la retrotranslocación se tiene el mismo comportamiento que en la translocación.

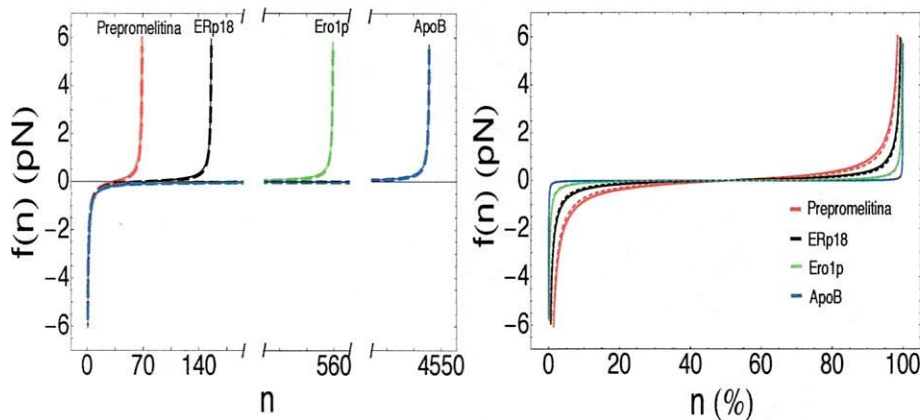
### 6.2.3. Tiempo de translocación en el régimen estático

Para calcular el tiempo de transporte utilizamos la ecuación 4.17. Primero describimos el efecto del abarrotamiento estático a condiciones fisiológicas para una cadena de tamaño promedio y después indicamos el efecto del abarrotamiento como función de la longitud. Adicionalmente, indicamos las diferencias que existen con el régimen dinámico y el sistema diluido.

### 6.2.4. Tiempo de translocación y retrotranslocación como función de $\phi_{\text{cit}}$ y $\phi_{\text{RE}}$

Para ejemplificar el efecto del abarrotamiento estático calculamos el tiempo de transporte para una cadena de tamaño promedio como Ero1p bajo las condiciones de abarrotamiento del citoplasma y del lumen del RE dadas por las expresiones 5.1 y 5.2. En la Figura 6.11, se muestran los tiempos de transporte para la translocación y la retrotranslocación para todos los posibles valores de  $\phi_{\text{cit}}$  y  $\phi_{\text{RE}}$ , como función de  $\Delta\phi$ .

El tiempo de translocación para Ero1p va desde 4.3 hasta 8.7 ms mientras que en la retrotranslocación el intervalo es de 3.7 hasta 11 ms. Estos tiempos son mayores al tiempo de translocación en el sistema diluido (0.4 ms, ilustrado

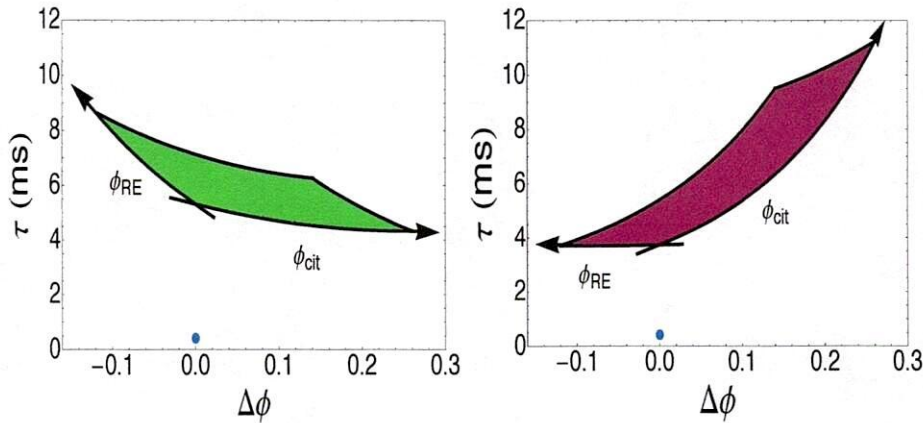


**Figura 6.10:** Fuerza de translocación para cadenas de tamaño  $N = 70, 157, 560$  y  $4536$ , que corresponden al número de monómeros de las proteínas prepromelitina, Erp18, Ero1p, y ApoB, respectivamente. Las líneas a trozos se refieren a la fuerza en un ambiente diluido y las líneas continuas a la fuerza en un sistema abarrotado estático bajo las condiciones de abarrotamiento  $\phi_{\text{cit}} = \phi_{\text{ER}} = 0.24$ . Izquierda: fuerza como función del número de monómeros translocados  $n$ ; derecha: fuerza como función del porcentaje de la cadena translocado.

como un punto en la Figura 6.11). En la translocación el tiempo es mayor de entre 11 hasta 22 veces y en la retrotranslocación de entre 9 hasta 27 veces. Este incremento no tiene el mismo orden de magnitud que el caso dinámico, donde el tiempo aumenta en un factor de 100.

Para la translocación, el tiempo disminuye cuando aumenta la concentración  $\phi_{\text{cit}}$  manteniendo fija  $\phi_{\text{RE}}$ . En la retrotranslocación sucede lo mismo la concentración  $\phi_{\text{RE}}$  aumenta manteniendo fija  $\phi_{\text{cit}}$ . En la Figura 6.11 las flechas indican el cambio en el tiempo al incrementar las fracciones  $\phi_{\text{cit}}$  y  $\phi_{\text{RE}}$ . La disminución en el tiempo al aumentar la  $\phi$  se debe a la contribución energética. En la translocación, un incremento de la concentración  $\phi_{\text{cit}}$  reduce las conformaciones de la cadena en el citoplasma y por lo tanto el lado preferido es el lumen donde más conformaciones son permitidas. Este resultado es diferente del caso dinámico donde la difusividad domina el transporte.

El tiempo de transporte crece con la longitud, en la Tabla 6.6, se muestran los tiempos mínimos y máximos para la translocación y la retrotranslocación, y se indica el valor de  $\Delta\phi$  para el cual se obtienen. Para cadenas cortas como la prepromelitina el tiempo por abarrotamiento estático es de unas cuantas decenas de microsegundos y para cadenas muy grandes como ApoB el tiempo es de apenas segundos. En la Figura 6.12, se muestra el efecto del abarrotamiento para cadenas de diferente tamaño en translocación y en retrotranslocación. Para cadenas cortas, el intervalo de tiempo para la retrotranslocación es ligeramente más amplio (ver Tabla 6.6) que el de translocación, sin embargo, para cadenas



**Figura 6.11:** Tiempo de transporte como función de las condiciones de abarrotamiento para una cadena como Ero1p de  $N = 560$ . Las flechas indican las direcciones de crecimiento para las fracciones de ocupación  $\phi_{\text{cit}}$  y  $\phi_{\text{RE}}$ . El punto azul corresponde al tiempo en un ambiente diluido. Derecha: translocación; izquierda, retrotranslocación.

largas ocurre lo opuesto como puede apreciarse de la Figura 6.12.

Comparando con el caso diluido, el abarrotamiento estático a valores fisiológicos incrementa la translocación de una cadena corta como la prepromilita de 4.3 hasta 6.3 veces, mientras que para una cadena larga como ApoB es de 31 hasta 74 veces, al disminuir  $\Delta\phi$  de 0.26 hasta  $-0.12$ ; en retrotranslocación para las mismas cadenas los incrementos son: de 3.3 hasta 15 veces (prepromelitina) y de 28 hasta 59 veces (ApoB), al incrementar  $\Delta\phi$  de  $-0.12$  hasta 0.26. En la Figura 6.12, se ha graficado el tiempo de translocación en el caso diluido el cual aparece como una línea puntada bajo la escala de la gráfica. Estos resultados para cadenas grandes, donde ocurre un aumento en el tiempo en un factor de  $\approx 10^2$ , no se comparan con el caso de abarrotamiento dinámico que retrasa los tiempos de transporte hasta en un factor de  $10^4$ .

### Velocidades de transporte

Bajo condiciones fisiológicas de abarrotamiento estático las máximas velocidades de translocación ( $v = N/\tau$ ) se obtienen con  $\phi_{\text{cit}} = 0.38$  y  $\phi_{\text{RE}} = 0.12$ , cuando  $\Delta\phi = 0.26$ . Para las cadenas prepromelitina, ERp18, Ero1p y ApoB, dichas velocidades calculadas usando los datos de la Tabla 6.6 son  $5.4 \times 10^6$ ,  $1.3 \times 10^6$ ,  $1.3 \times 10^5$  y  $2.5 \times 10^3$  aa/s, respectivamente; valores similares y del mismo orden de magnitud se obtienen para las velocidades mínimas de translocación con  $\phi_{\text{cit}} = 0.12$  y  $\phi_{\text{RE}} = 0.24$ . Estas velocidades son un orden de magnitud menor que las correspondientes al caso diluido. Esta reducción en la velocidad por abarrotamiento con agentes estáticos no es del mismo orden de magnitud que el

**Tabla 6.6:** Tiempos de translocación y retrotranslocación en un sistema abarrotado estático  $\tau^{\text{est}}$  y en un sistema diluido  $\tau^{\text{dil}}$ .

Análogo	N	$\tau^{\text{dil}}$	$\tau^{\text{est}}(\Delta\phi)$			
			Translocación		Retrotranslocación	
			$\Delta\phi$		$\Delta\phi$	
			-0.12	0.26	-0.12	0.26
Prepromelitina	70	3.0 $\mu\text{s}$	19 $\mu\text{s}$	13 $\mu\text{s}$	10 $\mu\text{s}$	45 $\mu\text{s}$
ERp18	157	21 $\mu\text{s}$	203 $\mu\text{s}$	124 $\mu\text{s}$	100 $\mu\text{s}$	383 $\mu\text{s}$
Ero1p	560	0.4 ms	8.7 ms	4.3 ms	3.7 ms	11 ms
—	1000	1.7 ms	48 ms	22 ms	20 ms	53 ms
ApoB	4536	58 ms	4.3 s	1.8 s	1.6 s	3.4 s

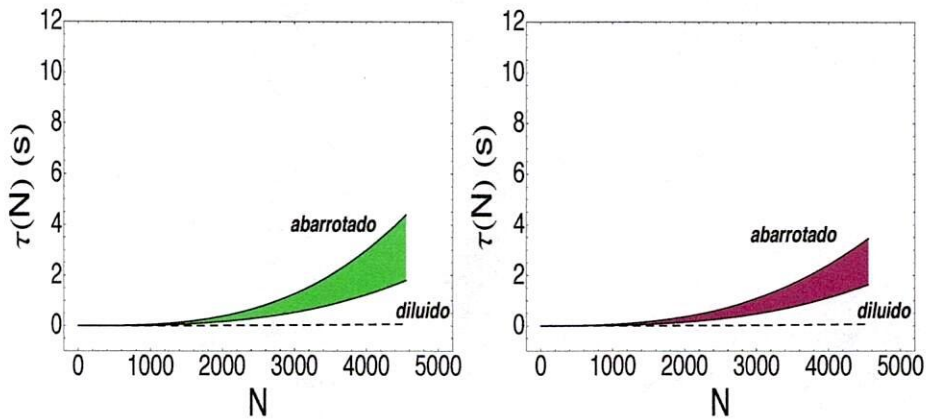
abarrotamiento por agentes dinámicos, en donde se reduce hasta en tres ordenes de magnitud para las cadenas más largas.

Para retrotranslocación las velocidades tienen el mismo orden de magnitud que las de translocación, por ejemplo, las máximas velocidades con  $\phi_{\text{cit}} = 12$  y  $\phi_{\text{RE}} = 0.24$ , para las cadenas prepromelitina, ERp18, Ero1p y ApoB son  $7.0 \times 10^6$ ,  $1.6 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^5$  y  $2.8 \times 10^3$  aa/s, respectivamente. Al igual que en translocación, estos resultados son al menos un orden de magnitud menor a las velocidades en el caso diluido.

Las velocidades de translocación y de retrotranslocación, por ser menores que las del caso diluido, indican que existe una clara diferencia entre las velocidades de translocación en un ambiente diluido y en un ambiente abarrotado por agentes estáticos. Sin embargo, esta diferencia no es tan notoria comparada con la translocación en un ambiente abarrotado por agentes dinámicos, el cual corresponde al abarrotado medio intracelular.

### 6.3. Sinergia entre el coeficiente de difusión y la energía libre en el tiempo de transporte

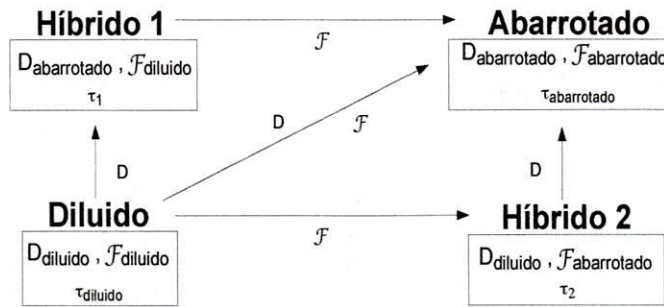
Los tiempos de translocación y de retrotranslocación bajo condiciones de abarrotamiento dinámico o estático difieren significativamente de los correspondientes en el caso diluido, esta diferencia es mayor para cadenas largas. El cálculo de los tiempos de transporte a partir de la ecuación 4.17 depende de las expresiones usadas para el coeficiente de difusión y la energía libre. Para identificar la contribución de cada término, calculamos el tiempo de translocación utilizando dos modelos híbridos de prueba, el primero representando un sistema en el cual una cadena tiene asociada la difusión del régimen diluido y la energía libre del sistema abarrotado dinámico/estático, y el segundo representando un sistema en el cual la cadena tiene asociada la difusión del sistema abarrotado dinámico/estático y la energía libre correspondiente al caso diluido. Estos modelos de prueba se encuentran entre el modelo de cadena en un sistema diluido



**Figura 6.12:** Tiempo de transporte en un sistema abarroto dinámico como función del tamaño de la cadena en transporte. Las regiones en color corresponden al tiempo para las diferentes condiciones de abarroto del citoplasma y del lumen del RE. La línea a trozos corresponde al tiempo de transporte en un sistema diluido. Derecha: translocación; izquierda, retrotranslocación.

y el modelo de cadena en un sistema abarroto. Con estos modelos, cuantificamos el efecto sobre el tiempo de translocación al despreciar el abarroto sobre el coeficiente de difusión o sobre la energía libre, tomando como modelo de referencia al sistema diluido.

En la Figura 6.13, se indican las variables de los modelos híbridos de prueba, del sistema diluido y del sistema abarroto. Las flechas indican en cual variable se ha incluido el efecto del abarroto.



**Figura 6.13:** Sistemas utilizados para cuantificar el efecto de la difusión ( $D$ ) y de la energía libre ( $\mathcal{F}$ ) en el tiempo de transporte ( $\tau$ ). En el esquema, las flechas indican el cambio en el tiempo debido a la difusión y/o la energía libre.

### 6.3.1. Sinergia en la translocación para el caso dinámico

En la Tabla 6.7, se muestra el tiempo de translocación en el régimen diluido, los modelos híbridos en los cuales se ha remplazado la difusión o la energía libre por las correspondientes del sistema abarrotamiento dinámico, y el régimen dinámico. En los cálculos con abarrotamiento se utilizó  $\phi_{\text{cit}} = 0.38$  y  $\phi_{\text{RE}} = 0.24$ , condiciones que dan los máximos tiempos de translocación; para otras condiciones de abarrotamiento los resultados son similares.

Para el primer modelo híbrido, se considera el efecto del abarrotamiento sobre el coeficiente de difusión pero no sobre la energía libre, el tiempo en este modelo se designa como  $\tau_1$  y se muestra en la columna IV de la Tabla 6.7. Para el segundo modelo híbrido, se considera el efecto del abarrotamiento sobre la energía libre pero no sobre la difusión, el tiempo correspondiente  $\tau_2$  se muestra en la columna V de la Tabla 6.7. En la Figura 6.14, se grafican  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ , el tiempo del sistema diluido  $\tau_{\text{dil}}$  y el tiempo del sistema abarrotado dinámico  $\tau_{\text{din}}$ . Para cadenas pequeñas (alrededor de  $N = 100$ ),  $\tau_1$  es similar al tiempo del sistema abarrotamiento dinámico,  $\tau_2$  es similar al tiempo en el sistema diluido  $\tau_{\text{dil}}$ , con  $\tau_1 \gg \tau_2$ , ver Figura 6.14 y la Tabla 6.7, esto significa que el cambio en la difusión por el abarrotamiento es más importante para el tiempo que el cambio por abarrotamiento en la energía libre. Para cadenas con  $N \approx 1000$ ,  $\tau_1$  es similar a  $\tau_2$ , esto significa que el cambio en el coeficiente de difusión o en la energía libre por abarrotamiento tiene el mismo efecto sobre el tiempo. Para cadenas grandes de  $N \gg 1000$ , el cambio en la energía libre por abarrotamiento es más importante sobre el tiempo que el cambio en el coeficiente de difusión.

Ambos tiempos,  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , difieren significativamente del tiempo en el régimen dinámico  $\tau_{\text{din}}$ , ver última columna de la Tabla 6.7 y la Figura 6.14, ni la suma de ellos ni el producto podría igualar el efecto del abarrotamiento dinámico en el tiempo, este resultado indica que existe sinergia entre la difusión y la energía libre. Esta sinergia tiene implicaciones sobre los modelos de translocación bajo condiciones de abarrotamiento, ya que implica que los efectos del abarrotamiento sobre ambos, la difusión y la energía libre, no pueden despreciarse al modelar el transporte. Esta sinergia debe considerarse en futuros modelos y experimentos de translocación bajo condiciones de abarrotamiento fisiológico.

**Tabla 6.7:** Tiempos de translocación en los sistemas: diluido  $\tau_{\text{dil}}$ , híbrido con la difusividad del caso dinámico  $\tau_1(D_{\text{din}}, \mathcal{F}_{\text{dil}})$ , híbrido con la energía libre del caso dinámico  $\tau_2(D_{\text{dil}}, \mathcal{F}_{\text{din}})$  y abarrotado dinámico  $\tau_{\text{din}}$ .

Análogo	$N$	$\tau_{\text{dil}}$	$\tau_1(D_{\text{din}}, \mathcal{F}_{\text{dil}})$	$\tau_2(D_{\text{dil}}, \mathcal{F}_{\text{din}})$	$\tau_{\text{din}}$
Prepromelitina	70	3.0 $\mu\text{s}$	25 $\mu\text{s}$	3.7 $\mu\text{s}$	32 $\mu\text{s}$
ERp18	157	21 $\mu\text{s}$	247 $\mu\text{s}$	36 $\mu\text{s}$	436 $\mu\text{s}$
Ero1p	560	0.4 ms	9.3 ms	2.4 ms	50 ms
—	1000	1.7 ms	50 ms	25 ms	682 ms
ApoB	4536	58 ms	4.0 s	77 s	80 min

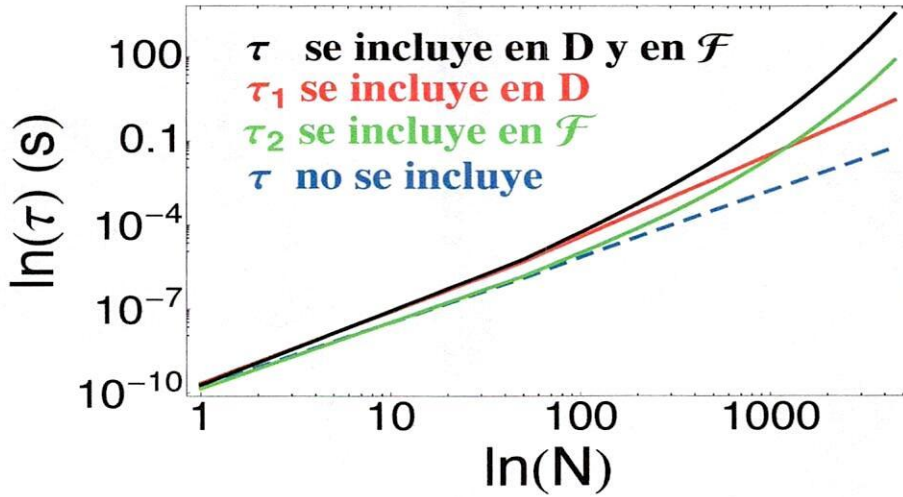


Figura 6.14: Tiempo de translocación en un sistema diluido, un sistema abarrotado dinámico, y dos sistemas híbridos en los cuales se desprecia el efecto del abarrotamiento dinámico sobre la difusión o sobre la energía libre.

Otra forma de cuantificar el cambio en el tiempo al cambiar la difusión  $D$  o la energía libre  $\mathcal{F}$ , tomando como referencia al caso diluido, consiste en calcular para cadenas de diferente tamaño, la razón  $\tau/\tau_{\text{dil}}$ , cantidad que representa el factor en el que cambia el tiempo diluido. En la Tabla 6.8, se muestran los factores que introducen los modelos híbridos y el caso abarrotado dinámico. De los factores se observa que ninguno de los modelos híbridos modifica el tiempo de translocación con el mismo orden de magnitud que lo hace el caso dinámico. El cambio que generan los modelos híbridos puede ser hasta  $10^3$  veces menor que el producido por abarrotamiento dinámico. El efecto sinérgico de la difusión y de la energía libre por abarrotamiento dinámico puede aproximarse como  $\tau_{\text{din}}/\tau_{\text{dil}} \approx (\tau_1/\tau_{\text{dil}})(\tau_2/\tau_{\text{dil}})$ , como lo muestran los datos de las dos últimas columnas de la Tabla 6.8, observe el orden de magnitud y el coeficiente.

Despreciar el efecto del abarrotamiento en una de las cantidades, difusión o energía libre, menosprecia el efecto del abarrotamiento en al menos uno y hasta cuatro ordenes de magnitud (dependiendo del tamaño de la cadena) sobre el tiempo de translocación, como se observa al comparar los ordenes de magnitud entre  $\tau_1/\tau_{\text{dil}}$ ,  $\tau_2/\tau_{\text{dil}}$  y  $\tau_{\text{din}}/\tau_{\text{dil}}$  en la Tabla 6.8.

### 6.3.2. Sinergia en la translocación para el caso estático

En el análisis anterior, los modelos híbridos se construyeron cambiando la difusión y la energía libre del sistema diluido por las correspondientes al régimen abarrotado dinámico, en la Tabla 6.9, se muestran los tiempos para los mode-

**Tabla 6.8:** Factor de cambio en el tiempo de translocación del sistema diluido cuando se cambia la difusión y/o la energía libre por la correspondiente en el régimen abarrotado dinámico.

Análogo	$N$	$\frac{\tau_1(D_{\text{din}}, \mathcal{F}_{\text{dil}})}{\tau_{\text{dil}}}$	$\frac{\tau_2(D_{\text{dil}}, \mathcal{F}_{\text{din}})}{\tau_{\text{dil}}}$	$\frac{\tau_{\text{din}}}{\tau_{\text{dil}}}$	$\frac{\tau_1}{\tau_{\text{dil}}} \frac{\tau_2}{\tau_{\text{dil}}}$
Prepromelitina	70	$8.3 \times 10^0$	$1.2 \times 10^0$	$1.1 \times 10^1$	$1.0 \times 10^1$
ERp18	157	$1.2 \times 10^1$	$1.7 \times 10^0$	$2.1 \times 10^1$	$2.0 \times 10^1$
Ero1p	560	$2.3 \times 10^1$	$6.0 \times 10^0$	$1.2 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2$
—	1000	$2.9 \times 10^1$	$1.5 \times 10^1$	$4.0 \times 10^2$	$4.4 \times 10^2$
ApoB	4536	$6.9 \times 10^1$	$1.3 \times 10^3$	$8.3 \times 10^4$	$9.0 \times 10^4$

los híbridos pero ahora considerando la difusión y la energía libre del régimen estático. Los cálculos se realizaron con  $\phi_{\text{cit}} = 0.12$  y  $\phi_{\text{RE}} = 0.24$ , condiciones bajo las cuales se obtienen los mayores tiempos de translocación.

Tomando como referencia el tiempo en el sistema diluido, de los datos de la Tabla 6.9, se observa que el cambio en el tiempo por cambiar la difusión es mayor que el cambio generado por cambiar la energía libre. Este resultado es independiente del tamaño de la cadena, dentro del intervalo de tamaño de la proteínas de interés, a diferencia del resultado de los modelos híbridos cuando el abarrotamiento es dinámico, en donde el tamaño de la cadena influye el resultado. Al comparar los tiempos de los modelos híbridos con el caso puramente estático, se observa que el tiempo en el modelo híbrido en el cual se reemplazó la difusión ( $\tau_1$ ) tiene el mismo orden de magnitud que el tiempo estático  $\tau_{\text{est}}$  (comparar la columna IV con la columna VI en la Tabla 6.9). El tiempo que se obtiene por cambiar la energía libre ( $\tau_2$  del segundo modelo híbrido) es al menos un orden de magnitud menor que  $\tau_1$ , como se observa al comparar los datos de  $\tau_1$  y  $\tau_2$  en la Tabla 6.9. Por lo tanto, el efecto del abarrotamiento estático sobre la difusión resulta de mayor importancia que el efecto sobre la energía libre cuando se calcula el tiempo de translocación.

**Tabla 6.9:** Tiempos de translocación en los sistemas: diluido  $\tau_{\text{dil}}$ , híbrido con la difusividad del caso estático  $\tau_1(D_{\text{est}}, \mathcal{F}_{\text{dil}})$ , híbrido con la energía libre del caso estático  $\tau_2(D_{\text{dil}}, \mathcal{F}_{\text{est}})$  y abarrotado estático  $\tau_{\text{est}}$ .

Análogo	$N$	$\tau_{\text{dil}}$	$\tau_1(D_{\text{est}}, \mathcal{F}_{\text{dil}})$	$\tau_2(D_{\text{dil}}, \mathcal{F}_{\text{est}})$	$\tau_{\text{est}}$
Prepromelitina	70	3.0 $\mu\text{s}$	16 $\mu\text{s}$	3.4 $\mu\text{s}$	19 $\mu\text{s}$
ERp18	157	21 $\mu\text{s}$	171 $\mu\text{s}$	23 $\mu\text{s}$	203 $\mu\text{s}$
Ero1p	560	0.4 ms	7.3 ms	0.5 ms	8.7 ms
—	1000	1.7 ms	41 ms	1.8 ms	48 ms
ApoB	4536	58 ms	3.7 s	61 ms	4.3 s

Para determinar el orden de magnitud con el cual contribuyen la difusión y

la energía libre estáticas al tiempo de translocación calculamos las razones  $\tau/\tau_{\text{dil}}$  para cadenas de diferentes tamaño y además las comparamos con  $\tau_{\text{est}}/\tau_{\text{dil}}$ , ver Tabla 6.10. Al cambiar la difusión se cambia el tiempo a lo más en un orden de magnitud (principalmente para cadenas largas), al cambiar la energía libre el orden de magnitud no cambia (ver columnas para  $\tau_1/\tau_{\text{dil}}$  y  $\tau_2/\tau_{\text{dil}}$ ). De entre los dos modelos, la razón  $\tau_1/\tau_{\text{dil}}$  se aproxima más, en orden de magnitud, a  $\tau_{\text{est}}/\tau_{\text{dil}}$  (el caso puramente estático). Si consideramos la sinergia como en el caso dinámico, se encuentra que  $\tau_{\text{est}}/\tau_{\text{dil}} \approx (\tau_1/\tau_{\text{dil}})(\tau_2/\tau_{\text{dil}})$ , ver las dos últimas columnas de la Tabla 6.10, lo cual reafirma el efecto sinérgico en el tiempo de translocación.

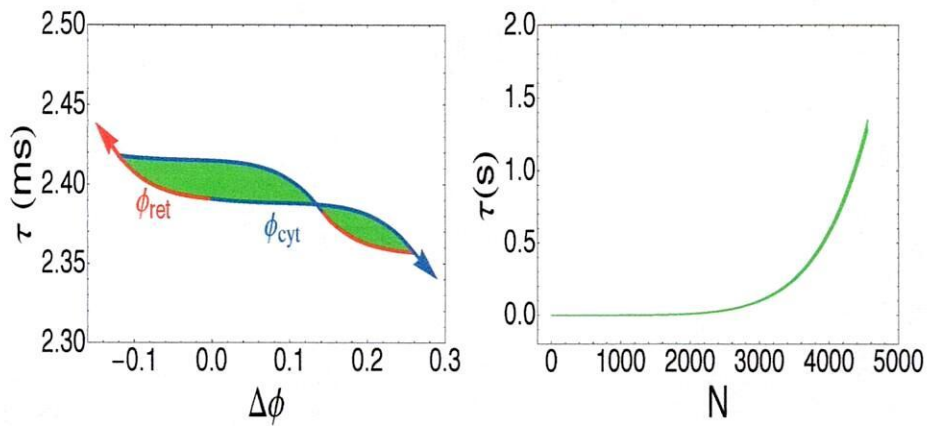
**Tabla 6.10:** Factor de cambio en el tiempo de translocación del sistema diluido cuando se cambia la difusión y/o la energía libre por la correspondiente en el régimen abarrotado estático.

Análogo	$N$	$\frac{\tau_1(D_{\text{est}}, \mathcal{F}_{\text{dil}})}{\tau_{\text{dil}}}$	$\frac{\tau_2(D_{\text{dil}}, \mathcal{F}_{\text{est}})}{\tau_{\text{dil}}}$	$\frac{\tau_{\text{est}}}{\tau_{\text{dil}}}$	$\frac{\tau_1}{\tau_{\text{dil}}} \frac{\tau_2}{\tau_{\text{dil}}}$
Prepromelitina	70	$5.3 \times 10^0$	$1.1 \times 10^0$	$6.3 \times 10^0$	$6.0 \times 10^0$
ERp18	157	$8.1 \times 10^0$	$1.1 \times 10^0$	$9.7 \times 10^0$	$8.9 \times 10^0$
Ero1p	560	$1.8 \times 10^1$	$1.2 \times 10^0$	$2.2 \times 10^1$	$2.3 \times 10^1$
—	1000	$2.4 \times 10^1$	$1.0 \times 10^0$	$2.8 \times 10^1$	$2.6 \times 10^1$
ApoB	4536	$6.4 \times 10^1$	$1.0 \times 10^0$	$7.4 \times 10^1$	$6.7 \times 10^1$

### 6.3.3. El tiempo de translocación cuando el coeficiente de difusión es constante

El tiempo de translocación depende del coeficiente de difusión y de la energía libre, ambos dependientes del grado de abarrotamiento  $\phi$ . Analizar el efecto del abarrotamiento sobre el tiempo de translocación mediante la energía libre únicamente, significa considerar un coeficiente de difusión constante en  $\phi$ , pero dependiente del tamaño de la cadena. Por simplicidad, calculamos el tiempo de translocación utilizando para el coeficiente de difusión el del ambiente diluido, ecuación 5.3. Para una cadena de tamaño promedio como Ero1p, de  $N = 560$ , el tiempo como función de las diferencias de ocupación  $\Delta\phi$  se muestra en la Figura 6.15.

Para  $N = 560$ , como función de  $\Delta\phi$ , el tiempo mínimo de translocación es 2.36 ms, el tiempo máximo 2.42 ms, apenas difiere del mínimo en un 2.5 %, ver Figura 6.15. La diferencia entre el tiempo mínimo y el tiempo máximo aumenta con el tamaño de la cadena, para las cadenas más grandes como ApoB, la diferencia es de un 6 %. En la Figura 6.15, se muestra el tiempo como función del tamaño para todas las posibles condiciones de abarrotamiento fisiológicas. Note que el intervalo de tiempos es muy estrecho. Adicionalmente, el tiempo considerando la difusión independiente de  $\phi$  es varios ordenes de magnitud menor al tiempo del sistema abarrotado dinámico, cuando el coeficiente de difusión es



**Figura 6.15:** Tiempo de translocación con un coeficiente de difusión independiente de  $\phi$ . Izquierda: tiempo de translocación como función de  $\Delta\phi$ . Derecha: tiempo de translocación para cadenas de diferente tamaño para todas las posibles condiciones de abarrotamiento fisiológico.

dependiente de  $\phi$  (comparar las columnas V y VI de la Tabla 6.7), esto reafirma la importancia de considerar el efecto del abarrotamiento en el coeficiente de difusión al estudiar la translocación.

## Capítulo 7

# Conclusiones

En este trabajo, utilizando modelos estéricos de cadenas ideales, hemos estudiado el efecto del abarrotamiento macromolecular a condiciones fisiológicas sobre la translocación de preproteínas a través de la membrana del retículo endoplásmico. Para cuantificar el efecto del abarrotamiento, calculamos diferentes propiedades físicas de la translocación para cadenas cuyos tamaños corresponden al de cadenas translocadas en los sistemas biológicos, como son la membrana del retículo endoplásmico en células eucariotas o la membrana periplásmica en bacterias. Para determinar la importancia del grado de abarrotamiento, así como su comportamiento móvil, comparamos las siguientes propiedades que se obtienen para la translocación y la retrotranslocación en un sistema diluido con las correspondientes en un sistema abarrotado dinámico y en un sistema abarrotado estático: energía libre  $\mathcal{F}$ , energía de activación  $E_a$ , fuerza  $f$  y tiempo promedio de primer paso al que designamos como tiempo de translocación y/o retrotranslocación  $\tau$ .

Al sistema diluido lo consideramos como referencia, por ser el modelo de translocación más simple, además de ser el más utilizado en experimentos para estudiar la translocación. Los modelos de translocación con abarrotamiento utilizados fueron dos casos límite propuestos por Gopinathan y Kim [35]; el sistema abarrotado dinámico, en el cual los agentes abarrotantes se mueven muy rápido colapsando a la cadena en una región globular, y el sistema abarrotado estático, en el que los agentes abarrotantes parecen estáticos durante el transporte de la cadena.

Los dos casos límite, llamados regímenes, quedan delimitados al compararse las tres escalas de tiempo características del sistema: el tiempo de translocación  $\tau$ , el tiempo característico asociado a la difusión de los agentes abarrotantes  $\tau_0$  y el tiempo de relajación de la cadena  $\tau_r$ . Las propiedades físicas del medio intracelular como la viscosidad, el grado de abarrotamiento por proteínas (medido por la fracción de ocupación en volumen o por la concentración) y la difusión de los abarrotantes (principalmente proteínas solubles), influyen en los tiempos  $\tau$ ,  $\tau_0$  y  $\tau_r$ ; al realizar el análisis de dichos tiempos, validamos al medio intracelular como un medio abarrotado por proteínas en un régimen dinámico,

dadas las propiedades físicas y las condiciones de abarrotamiento del citoplasma y el lumen del RE. Aunque el régimen estático no corresponde al abarrotado medio intracelular, también realizamos el análisis de la translocación para cuantificar el efecto del abarrotamiento cuando los agentes abarrotantes carecen de movimiento.

## 7.1. Translocación en el sistema diluido

Como sistema de referencia utilizamos al sistema diluido, del cual estudiamos la contribución entrópica de la cadena en el proceso de translocación. La parte entrópica de la cadena proviene de sus conformaciones posibles debido a la presencia de la pared (representando a la membrana en el sistema biológico) en la cual se restringe el paso de la cadena por un poro de ancho despreciable. Las propiedades asociadas al proceso de translocación debido a las conformaciones de la cadena son: la energía libre  $\mathcal{F}$ , energía de activación  $E_a$ , fuerza en translocación  $f$  y el tiempo de translocación  $\tau$ . Todas las propiedades son cantidades promedio y de ellas, la energía libre y la fuerza dependen del número de monómeros translocados  $n$ , mientras que la energía de activación y el tiempo de translocación solo dependen del tamaño de la cadena  $N$ .

Para translocación en un sistema diluido, la energía libre de una cadena presenta una barrera de energía simétrica, cuyos mínimos de energía se obtienen cuando toda la cadena se encuentra en un solo lado de la pared. El valor de la barrera de energía, o energía de activación crece logarítmicamente con el tamaño de la cadena, por lo tanto, el sistema de translocación debe proveer más energía para cadenas más grandes para realizar la translocación.

La fuerza asociada a la energía libre, otra manera de presentar la misma información pero más fácil de medirse, al principio y hasta que la mitad de la cadena ha atravesado es opuesta a la dirección de la translocación, volviéndose favorable cuando más de la mitad de la cadena ha sido translocada. La fuerza, máxima en magnitud, al inicio y final de la translocación es del orden de unos cuantos pico Newtons (5–6 pN), independientemente del tamaño de la cadena. Los valores máximos de la fuerza son comparables a valores estimados para diferentes sistemas de translocación reportados en la literatura (también de pico Newtons), lo cual indica la importancia de la contribución entrópica de la cadena al nivel de las fuerzas.

El cálculo del tiempo de translocación, además de la energía libre, requiere del coeficiente de difusión. Nosotros ajustamos datos experimentales de la difusión para proteínas de diferente tamaño en agua y utilizamos el ajuste correspondiente para calcular el tiempo. El tiempo de translocación va desde unos cuantos microsegundos para las cadenas más pequeñas, hasta decenas de milisegundos para las cadenas más grandes que se conocen.

En experimentos, en lugar de medir tiempos, se han reportado razones de translocación (o velocidades) dadas por el tamaño de la cadena  $N$  entre el tiempo de translocación  $\tau$ . Utilizando los cálculos del tiempo, las velocidades de translocación correspondientes difieren de las velocidades medidas en sistemas

diluidos *in vitro* [31, 101, 51] en dos características: *i*) no son constantes y *ii*) son mayores en varios ordenes de magnitud (de cuatro a siete ordenes de magnitud para cadenas de mayor a menor tamaño). Este resultado implica que en la translocación en los sistemas biológicos existen interacciones a parte de la estérica capaces de reducir considerablemente el tiempo de transporte.

En modelos futuros de translocación en un ambiente diluido, además de la contribución entrópica de la cadena, deben incluirse otras interacciones que ralenticen el transporte; una de ellas puede ser la proveniente del canal proteico anclado en la membrana por el cual cruza la cadena. La función principal del canal consiste en permitir el paso de la cadena y evitar el paso de otras moléculas a través de él durante la translocación e incluso en ausencia de transporte. Por ejemplo, para la translocación en bacterias, se ha propuesto que el poro debe ser abierto por la proteína SecA para que la cadena se mueva libremente por difusión durante la abertura [51].

## 7.2. Translocación en un sistema abarrotado

El grado de abarrotamiento en el citoplasma  $\phi_{\text{cit}}$  y en el lumen del retículo endoplásmico  $\phi_{\text{RE}}$  se debe principalmente a las proteínas solubles y está caracterizado por su fracción de ocupación en volumen (sus concentraciones respectivas son de 100–320 y de 100–200 mg/ml). La viscosidad, la difusión, así como también el grado de abarrotamiento del citoplasma y del lumen del RE, los definen como medios abarrotados dinámicos. Utilizando los regímenes dinámico y estático de Gopinathan y Kim, estudiamos el efecto del abarrotamiento a condiciones fisiológicas en las siguientes propiedades físicas: energía libre, energía de activación, fuerza y tiempo de translocación y de retrotranslocación. El régimen dinámico sirve para cuantificar el efecto del abarrotamiento celular mientras que el régimen estático indica el efecto del abarrotamiento a condiciones celulares cuando se desprecia la movilidad de los agentes abarrotantes.

Para calcular los tiempos de translocación y de retrotranslocación se requiere conocer la difusión de una preproteína en transporte, la cual depende del grado de abarrotamiento celular. Utilizamos ajustes a los coeficientes de difusión reportados para el citoplasma y el lumen del retículo endoplásmico de diferentes células. Estos datos, por ser medidos en el interior de las células, toman en cuenta el efecto del abarrotamiento macromolecular. En los ajustes para el citoplasma y el lumen del RE, el coeficiente de difusión cambia exponencialmente con el grado de abarrotamiento, mientras que la dependencia en el tamaño de la cadena, se ajusta al modelo de Zimm para la difusión en el citoplasma, y se ajusta al modelo de Rouse para la difusión en el lumen del RE.

### 7.2.1. Translocación en un sistema abarrotado dinámico

Considerando al sistema diluido como referencia, el abarrotamiento dinámico a concentraciones fisiológicas incrementa los valores en la energía libre. La energía libre presenta una barrera que puede considerarse simétrica por dos ra-

zonas: primero, los mínimos de energía del mismo valor se obtienen cuando la cadena se encuentra completamente en alguno de los lados de la membrana y el máximo de energía se alcanza cuando aproximadamente la mitad de la cadena es translocada; y segundo, las diferencias de ocupación en ambos lados de la membrana no modifican significativamente el valor de la energía libre y por lo tanto, tampoco la posición de la barrera. El principal efecto del abarrotamiento es un incremento en la energía de activación que es varias veces la energía de activación del sistema diluido; este incremento se amplifica con la longitud de la cadena. El incremento en la energía de activación implica que el sistema de translocación tiene que proveer más energía comparado con el sistema diluido para realizar la translocación, siendo mayor para las cadenas largas.

La fuerza durante la translocación es similar en comportamiento al caso diluido, opuesta a la translocación desde el inicio y hasta que la mitad de la cadena ha sido translocada y después favoreciendo la translocación. Las magnitudes máximas de la fuerza se obtienen al inicio y al final del transporte con valores similares al caso diluido e independientes del tamaño de la cadena y del grado de abarrotamiento. El principal efecto del abarrotamiento sobre la fuerza es la reducción de su tasa de variación, esto implica que al inicio la fuerza de oposición actúa con mayor intensidad durante más tiempo, y por lo tanto, el sistema de translocación debe realizar más trabajo comparado con el correspondiente al caso diluido. De igual forma, al final del transporte, la fuerza que favorece el transporte es más intensa y actúa por más tiempo, lo cual debe reducir el trabajo que realiza el sistema de translocación.

Los tiempos de translocación y de retrotranslocación dependen de las condiciones de abarrotamiento y del tamaño de la cadena. Debido a los rangos de concentraciones del citoplasma y del lumen del RE, se obtiene un intervalo de tiempo para la translocación y otro similar numéricamente para la retrotranslocación. En translocación y retrotranslocación, al fijar la concentración en uno de los lados de la pared y aumentar la concentración en el otro el tiempo de transporte aumenta; la ralentización por incrementos en las concentraciones se debe a la reducción en la difusividad de la cadena que domina a la parte entrópica proveniente de la energía libre. En cuanto al tamaño de la cadena, comparado con el sistema diluido, los tiempos de transporte se incrementan en un orden de magnitud para cadenas pequeñas y hasta en cuatro ordenes de magnitud para cadenas largas. Estos resultados indican que la translocación (o la retrotranslocación) en un sistema abarrotado dinámico es extremadamente lenta comparada con la translocación en un sistema diluido. El cambio tan pronunciado en los tiempos de transporte comparados con el caso diluido, se debe a que existe sinergia entre la difusión y la energía libre de una cadena en transporte, ambas cantidades dependen del tamaño de la cadena y del grado de abarrotamiento. Al desprestigiar el efecto del abarrotamiento en alguna de ellas, difusión o energía libre, no se consigue el mismo efecto sobre el tiempo, por lo tanto, no se debe desprestigiar el efecto del abarrotamiento al estudiar el transporte.

Las velocidades por abarrotamiento, asociadas a los tiempos de transporte, son menores a las velocidades calculadas para el sistema diluido. La diferencia entre ambos sistemas, disminuye con la longitud de la cadena, desde cuatro

hasta un orden de magnitud, para cadenas de interés fisiológico. Al compararlas con las velocidades de experimentos en ambientes diluidos (a nuestro saber no existen velocidades medidas en ambientes abarrotados) resultan seis ordenes de magnitud más grandes para cadenas cortas, y del mismo orden de magnitud para cadenas largas. Este resultado indica que la contribución estérica del abarrotamiento dinámico debe ser considerada, principalmente en cadenas largas. El intervalo de tamaños de cadenas para las cuales la velocidad de translocación bajo condiciones de abarrotamiento dinámico fisiológico cae en el intervalo de valores experimentales es amplio, por lo tanto, el efecto del abarrotamiento podría medirse experimentalmente con diferentes cadenas.

### 7.2.2. Translocación en un sistema abarrotado estático

El estudio del abarrotamiento estático, aunque no aplica a los sistemas biológicos, indica el efecto del abarrotamiento por agentes sin movimiento.

La energía libre, a diferencia del caso abarrotado dinámico, presenta una barrera asimétrica debido a las diferentes condiciones de abarrotamiento. Por la asimetría, la energía libre tiene sus mínimos cuando toda la cadena se encuentra en algún lado de la pared, favoreciendo energéticamente la región menos abarrotada. En translocación y en retrotranslocación, la barrera de energía da origen a energías de activación similares a las del caso diluido, y cuando se consideran todas las posibles condiciones de abarrotamiento, las energías de activación pueden diferir en no más de 1 kcal/mol. Para cadenas de diferente longitud la energía de activación es similar al caso diluido.

Los valores de la fuerza para la translocación no cambian significativamente comparados con el caso diluido. Por lo tanto, el trabajo que realiza el sistema de translocación debido al abarrotamiento estático debe ser similar al de la translocación en un sistema diluido.

Las diferentes condiciones de abarrotamiento del citoplasma y del lumen del RE dan origen a intervalos de tiempo similares para la translocación y la retrotranslocación. Dentro del rango de concentraciones fisiológicas, el tiempo de translocación aumenta cuando se incrementa la concentración del lumen de RE mientras se mantiene fija la concentración del citoplasma, pero el tiempo disminuye cuando se fija la concentración del lumen del RE mientras se incrementa la del citoplasma; el tiempo de retrotranslocación presenta un comportamiento similar. Este resultado que se obtiene al incrementar las concentraciones, difiere del caso dinámico en el cual el tiempo de transporte siempre aumenta. Por abarrotamiento estático, la disminución en los tiempos de transporte al aumentar la concentración coincide con la disminución en la energía libre, por lo cual, concluimos que la parte energética determina el tiempo de transporte. Esto difiere del caso dinámico donde domina la difusividad. Al tomar en cuenta el tamaño de la cadena, los tiempos de transporte comparados con el caso diluido, son mayores en un orden de magnitud para cadenas cortas y en dos ordenes de magnitud para cadenas largas; sin embargo, este incremento es mucho menor comparado al del caso dinámico, incluso con la sinergia entre la difusión y la energía libre.

Las velocidades de translocación resultan un orden de magnitud menor a las

del sistema diluido, debido a la sinergia de la difusión y la energía libre. Comparando, las velocidades quedan fuera del intervalo de las velocidades experimentales en ambientes diluidos, ya que son mayores, en seis ordenes de magnitud para cadenas cortas, y en tres ordenes de magnitud para cadenas largas.

### 7.3. Conclusión general

La parte conformacional de una cadena permite describir las siguientes propiedades físicas para el proceso de translocación: energía libre, energía de activación, fuerza y tiempos de transporte.

Bajo condiciones de abarrotamiento fisiológicas, las propiedades de translocación y de retrotranslocación en un régimen estático resultan similares a las correspondientes en un ambiente diluido, excepto en los tiempos de transporte para cadenas largas, debido a la sinergia entre la difusividad y la energía libre, cantidades dependientes del grado de abarrotamiento.

El abarrotamiento por proteínas, su difusión y la viscosidad del medio intracelular indican que el transporte de proteínas a través de una membrana en el interior de las células se lleva a cabo en un ambiente abarrotado por agentes dinámicos. Por abarrotamiento dinámico, todas las propiedades físicas incrementan su magnitud notablemente comparadas con las de translocación en un ambiente diluido, este incremento es mayor para cadenas largas. En los tiempos de transporte, el efecto del abarrotamiento dinámico se amplifica, debido a la sinergia entre la difusión y la energía libre. Para los procesos de translocación y de retrotranslocación, bajo diferentes condiciones de abarrotamiento, los resultados son muy similares; las diferencias entre ellos son pequeñas y solo se observan para altas concentraciones del citoplasma y del lumen del RE.

Los resultados en el régimen estático, por ser similares al caso diluido, difieren significativamente de los resultados en el régimen dinámico, lo cual destaca la importancia del dinamismo de los agentes abarrotantes en el medio intracelular.

Las velocidades de translocación en el sistema diluido, varios ordenes de magnitud mayores a las reportadas experimentalmente, indican que interacciones adicionales, a parte de la estérica, deben incluirse a fin de reproducir los valores experimentales. Tales interacciones deben ralentizar el transporte.

En conclusión, el abarrotamiento a condiciones fisiológicas, así como el comportamiento dinámico de los agentes abarrotantes, deben tomarse en cuenta al estudiar la translocación de proteínas usando modelos o experimentos, ya que la contribución estérica del abarrotamiento modifica significativamente las propiedades de la translocación, principalmente para cadenas largas, y más aún en los casos donde existe sinergia, como sucede en los tiempos de transporte que dependen de la difusión y de la energía libre, ambos afectados por el abarrotamiento. Para comprobar el efecto del abarrotamiento, se deben realizar experimentos en ambientes con viscosidad y condiciones de abarrotamiento fisiológicas. Adicionalmente, para mejorar los modelos de translocación, se deben incluir interacciones no estéricas que ralenticen el transporte, a fin de reproducir las velocidades experimentales en sistemas diluidos *in vitro*.

## Capítulo 8

# Perspectivas

En este trabajo de investigación, el estudio estuvo enfocado a cuantificar el efecto estérico del abarrotamiento sobre la translocación de polipéptidos. Para ello, tomamos en cuenta el potencial estérico por la presencia de la pared y de los agentes abarrotantes sobre una preproteína, considerada como una cadena ideal.

Trabajo de investigación a futuro, orientado a mejorar los modelos actuales de translocación que permitan comprender el funcionamiento de los sistemas biológicos de translocación, puede realizarse al incluir en los modelos estéricos: 1) la tendencia de un aminoácido a participar en una estructura helicoidal para que la cadena pueda adoptar una estructura nativa, 2) el proceso de abertura del poro (canal de translocación) para permitir la difusión libre de una cadena en translocación, 3) el grosor de la membrana donde está embebido el canal de translocación.

A continuación se hace un planteamiento de cada una de las propuestas de trabajo a futuro.

### 8.1. El efecto de la tendencia de un aminoácido a participar en una estructura helicoidal

En los modelos estéricos de translocación de polímeros, se toma en cuenta la reducción en conformaciones debido a la presencia de la pared, la presencia de agentes que obstruyen el paso de la cadena o la correlación de dos monómeros consecutivos [96, 64, 35, 75]. En estos modelos no se considera la tendencia de los monómeros de adoptar una estructura nativa como ocurre en las proteínas. Una primera aproximación, para considerar la tendencia de una cadena a adoptar una conformación estable, es el modelo de una cadena homopolimérica, en la cual, todos los monómeros tienen la misma tendencia para formar una estructura helicoidal [68]. En dicho modelo, se conoce de forma exacta la función de partición  $Z_{\text{hel}}$  para una cadena de  $N$  monómeros idénticos [68]. Con la función de partición, la energía libre debido a la tendencia helicoidal es:

$$F_{\text{hel}} = -k_{\text{B}}T \ln Z_{\text{hel}}. \quad (8.1)$$

Para una cadena en translocación, la energía libre para un segmento de  $n$  monómeros que se encuentra de un lado de la pared  $F(n)$ , está dada por la energía libre del segmento debido a la tendencia helicoidal  $F_{\text{hel}}$  y la energía libre del segmento debido al anclaje de un extremo al poro  $F_{\text{dil}}$ , como:

$$F(n) = F_{\text{hel}}(n) + F_{\text{dil}}(n) \quad (8.2)$$

donde  $F_{\text{dil}}$  está dada por la ecuación 3.19. La energía  $F_{\text{hel}}$  depende de la propensión helicoidal  $\omega$ , que es un parámetro medible experimentalmente [68]. El efecto de la tendencia helicoidal podría corroborarse experimentalmente para homopolímeros mediante el tiempo de translocación. En nuestros modelos, al calcular el tiempo con la ecuación 4.17, utilizando la ecuación 8.2 para la energía libre de un segmento, los resultados tienen el mismo orden de magnitud que los tiempos de translocación reportados experimentalmente en ambientes diluidos [101, 51]. La discusión en progreso de estos resultados es trabajo futuro.

## 8.2. El efecto de la abertura sobre el tiempo de translocación

En el modelo estérico de la translocación de una cadena en un ambiente diluido, el tiempo de translocación  $\tau$ , considerando la difusión de la cadena, va como  $\tau \propto N^2$ , ver Sección 6.1.4, donde  $N$  es el número de aminoácidos de la cadena. De resultados experimentales en sistemas diluidos *in vitro*, basados en una tasa de translocación constante [101, 31, 51], el tiempo de translocación es proporcional al número de aminoácidos de la cadena,  $\tau \propto N$ .

Al comparar nuestros resultados con los valores experimentales, el tiempo en el modelo estérico diluido resulta mayor en varios ordenes de magnitud, desde un factor de  $10^4$  para cadenas largas hasta un factor de  $10^7$  para cadenas cortas, ver Sección 6.1.4. Esta diferencia entre los tiempos, en varios ordenes de magnitud, se repite al comparar el tiempo experimental con el tiempo en el modelo de una cadena unidimensional que también considera la difusión de la cadena [91], ver Sección 6.1.4. La diferencia entre los tiempos de los modelos diluidos con el tiempo experimental, indica que existen interacciones que ralentizan el transporte y que no han sido incluidas en los modelo estéricos diluidos.

Incluir interacciones en el modelo diluido capaces de reproducir los datos experimentales permitirá entender mejor el funcionamiento del sistema de translocación. En los modelos biológicos de la translocación, se considera que: 1) parte del movimiento se debe a la difusión de la cadena [74] y 2) el acoplamiento de la energía de la hidrólisis del ATP sobre el sistema de translocación abre el canal y permite la difusión libre de la cadena [51]. Los resultados del modelo estérico diluido no concuerdan con un modelo biológico donde la translocación ocurre por pura difusión, ya que la translocación ocurriría muy rápido, de acuerdo a la comparación de los resultados numéricos.

Una propuesta de mejora al modelo estérico diluido consiste en incluir el proceso de abertura del canal que permite la libre difusión de la cadena. En este modelo, existe un lapso de tiempo durante el cual el canal se encuentra cerrado; cuando el ATP se encuentra accesible al sistema de translocación, éste acopla la energía de la hidrólisis para abrir el canal [51]. Para que la cadena se difunda libremente el canal debe encontrarse abierto; si es necesario, el proceso de abertura debe repetirse consecutivamente hasta conseguir la translocación completa de la cadena. Incluir este fenómeno de abertura en el modelo estérico diluido retrasaría el tiempo de transporte debido a los lapsos de tiempo en los cuales el canal se encuentra cerrado. Considerar el proceso de abertura, también permitiría relacionar la energía utilizada durante la translocación con el consumo de ATP, el cual puede medirse experimentalmente [101, 51].

### 8.3. El efecto del grosor de la membrana sobre la translocación de cadenas cortas

En los modelos estéricos de translocación, se considera que la membrana y el canal tienen grosor despreciable. Sin embargo, las membranas celulares son bicapas de fosfolípidos, y su grosor depende de las moléculas que las componen [54]. En bacterias, el canal de translocación de grosor 6.7 nm se encuentra embebido en una membrana de grosor 5 nm [73].

Durante la translocación, los aminoácidos de una preproteína deben atravesar la membrana de grosor 5 nm. Atravesando de forma lineal, el número de aminoácidos  $n_a$  que pueden encontrarse de forma transversal a la membrana es:  $n_a = \frac{L}{b}$ , donde  $L$  es el ancho de la membrana y  $b = 3.79 \text{ \AA}$  es la longitud de un aminoácido; ver Sección 5.5.

Con  $L = 5 \text{ nm}$ , el número de aminoácidos que pueden estar atravesando la membrana es  $n_a = 13$ . Esta cantidad no es despreciable para las cadenas en translocación más pequeñas. Por ejemplo, para las proteínas preprocecropina A y prepromelitina, de 64 y 70 aminoácidos [90], el porcentaje de la preproteína que puede estar atravesando la membrana es 20 y 18 %, respectivamente. Para cadenas de mayor tamaño, como Ero1p, una proteína de tamaño promedio de 560 aminoácidos, el porcentaje de la preproteína que puede estar atravesando la membrana es apenas un 2 %.

La reducción en conformaciones de la cadena debida a los aminoácidos atravesando la membrana modifica la energía libre de la cadena y por lo tanto, puede modificar las propiedades de la translocación. El cambio en las propiedades debe ser mayor para cadenas pequeñas tomando en cuenta el porcentaje de la cadena que se encuentra atravesando la membrana.

Una propuesta para considerar el efecto del grosor de la membrana consiste en modelar la translocación con una cadena que atraviesa un tubo de longitud 5 nm y ancho despreciable, el cual separa dos paredes rígidas. En este modelo, la reducción en conformaciones del segmento de cadena que se encuentra dentro del tubo debe considerarse mediante la energía libre.

# Bibliografía

- [1] Fernando A. Agarraberes and J. Fred Dice. Protein translocation across membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1513:1–24, 2001.
- [2] Nathan N. Alder and Steven M. Theg. Energy use by biological protein transport pathways. *Trends Biochem. Sci.*, 28(8):442–451, 2003.
- [3] Martine Arrio-Dupont, Georges Foucault, Monique Vacher, Philippe F. Devaux, and Sophie Cribier. Translational diffusion of globular proteins in the cytoplasm of cultured muscle cells. *Biophys J.*, 78:901–907, February 2000.
- [4] M. Madan Babu, Robin van der Lee, Natalia Sanchez de Groot, and Jörg Gsponer. Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 21(3):432–440, 2011.
- [5] Daniel S. Banks and Cécile Fradin. Anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding. *Biophys. J.*, 89:2960–2971, 2005.
- [6] G. T. Barkema, Parthapratim Biswas, and Henk van Beijeren. Diffusion with random distribution of static traps. *Phys. Rev. Letters*, 87(17):170601–1,4, 2001.
- [7] Thomas Becker, Shashi Bhushan, Alexander Jarasch, Jean-Paul Armache, Soledad Funes, Fabrice Jossinet, James Gumbart, Thorsten Mielke, Otto Berninghausen, Klaus Schulten, Eric Westhof, Reid Gilmore, Elisabeth C. Mandon, and Roland Beckmann. Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science*, 326(5958):1369–1373, 2009.
- [8] Edgar M. Blokhuis and Joris Kuipers. Thermodynamic expressions for the Tolman length. *J. Chem. Phys.*, 124:074701, 2006.
- [9] Carl Branden and John Tooze. *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishing, second edition, 1999.
- [10] David J. Brockwell, Godfrey S. Beddard, Emanuele Paci, Dan K. West, Peter D. Olmsted, D. Alastair Smith, and Sheena E. Radford. Mechanically unfolding the small, topologically simple protein L. *Biophys. J.*, 89:506–519, July 2005.

- [11] Guy C. Brown. Total cell protein concentration as an evolutionary constraint on the metabolic control distribution in cells. *J. Theor. Biol.*, 153:195–203, 1991.
- [12] Tito Cali, Omar Vanoni, and Maurizio Molinari. The endoplasmic reticulum: crossroads for newly synthesized polypeptide chains. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 83:135–179, 2008.
- [13] Mary K. Campbell and Shawn O. Farrell. *Bioquímica*. Thomson, cuarta edition, 2004.
- [14] Kurt S. Cannon, Eran Or, William M. Cleomans Jr., Yoko Shibata, and Tom A. Rapoport. Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *J. Cell Biol.*, 169(2):219–225, 2005.
- [15] Robert S. Cantor. Lateral pressure in cell membranes: a mechanism for modulation of protein function. *J. Phys. Chem. B*, 101(10):1723–1725, 1997.
- [16] M. Castelnovo, R. K. Bowles, H. Reiss, and W. M. Gelbart. Osmotic force resisting chain insertion in a colloidal suspension. *Eur. Phys. J. E.*, 10:191–197, 2003.
- [17] Scott Cayley, Barbara A. Lewis, Harry J. Guttman, and M. Thomas Record Jr. Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity: implications for protein–DNA interactions *in vivo*. *J. Mol. Biol.*, 222:281–300, 1991.
- [18] Clement C. Chow, Charles Chow, Vinodhkumar Raghunathan, Theodore J. Huppert, Erin B. Kimball, and Silvia Cavagnero. Chain length dependence of apomyoglobin folding: structural evolution from misfolded sheets to native helices. *Biochemistry*, 42(23):7090–7099, 2003.
- [19] Michael Christensen and J. Boiden Pederson. Diffusion in inhomogeneous and anisotropic media. *J. Chem. Phys.*, 119(10):5171–5175, September 2003.
- [20] Chia-Lin Chyan, Fan-Chi Lin, Haibo Peng, Jian-Min Yuan, Chung-Hung Chang, Sheng-Hsien Lin, and Guoliang Yang. Reversible mechanical unfolding of single ubiquitin molecules. *Biophys. J.*, 87:3995–4006, December 2004.
- [21] Geoffrey M. Cooper and Robert E. Hausman. *The Cell: a Molecular Approach*. Sinauer Associates, 2007.
- [22] Brian R. Daniels, Byron C. Masi, and Denis Wirtz. Probing single-cell micromechanics *in vivo*: the microrheology of *C. elegans* developing embryos. *Biophys. J.*, 90:4712–4719, June 2006.

- [23] Emmanuel Dauty and A. S. Verkman. Molecular crowding reduces to a similar extent the diffusion of small solutes and macromolecules: measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Mol. Recognit.*, 17:441–447, 2004.
- [24] Mark J. Dayel, Erik F. Y. Hom, and A. S. Verkman. Diffusion of green fluorescent protein in aqueous-phase lumen of endoplasmic reticulum. *Biophys. J.*, 76:2843–2851, 1999.
- [25] James A. Dix and A. S. Verkman. Crowding effects on diffusion in solutions and cells. *Annu. Rev. Biophys.*, 37:247–263, 2008.
- [26] M. Doi and S. F. Edwards. *The Theory of Polymer Dynamics*. Clarendon Press Oxford, 1986.
- [27] M. D. Donsker and S. R. S. Varadhan. Asymptotics for the Wiener sausage. *Comm. Pur. Appl. Math.*, 28:525–565, 1975.
- [28] Shannon M. Doyle, Emory H. Braswell, and Carolyn M. Teschke. SecA folds via a dimeric intermediate. *Biochemistry*, 39:11667–11676, 2000.
- [29] R. John Ellis. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 11:114–119, 2001.
- [30] R. John Ellis. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 26(10):597–604, October 2001.
- [31] Karl J. Erlandson, Eran Or, Andrew R. Osborne, and Tom A. Rapoport. Analysis of polypeptide movement in the SecY channel during SecA-mediated protein translocation. *J. Biol. Chem.*, 283(23):15709–15715, 2008.
- [32] A. Forer and R. D. Goldman. The concentrations of dry matter in mitotic apparatuses *in vivo* and after isolation from sea-urchin zygotes. *J. Cell Sci.*, 10:387–418, 1972.
- [33] Glenn H. Fredrickson. *The Equilibrium Theory of Inhomogeneous Polymers*. Oxford Science Publications, 2006.
- [34] Robert B. Freedman, Angela D. Dunn, and Lloyd W. Ruddock. Protein folding: A missing redox link in the endoplasmic reticulum. *Curr. Biol.*, 8(13):R468–R470, 1998.
- [35] Ajay Gopinathan and Yong Woon Kim. Polymer translocation in crowded environments. *Phys. Rev. Letters*, 99:228106(1–4), 2007.
- [36] Peter Grassberger and Itamar Procaccia. The long time properties of diffusion in a medium with static traps. *J. Chem. Phys.*, 77(12):6281–6284, 1982.

- [37] Alexander Yu. Grosberg and Alexei R. Khokhlov. *Statistical Physics of Macromolecules*. AIP, 1994.
- [38] Einav Gross, David B. Kastner, Chris A. Kaiser, and Deborah Fass. Structure of Ero1p, source of disulfide bonds for oxidative protein folding in the cell. *Cell*, 117:601–610, 2004.
- [39] Ari Helenius, Thorsten Marquardt, and Ineke Braakman. The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *TRENDS in Cell Biol.*, 2:227–231, 1992.
- [40] Henry Hess. Engineering applications of biomolecular motors. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 13:429–450, 2011.
- [41] Deanna L. Howarth, Ana M. Vacaru, Orkhontuya Tsedensodnom, Elisabetha Mormone, Natalie Nieto, Lindsey M. Costantini and Erik L. Snapp, and Kisten C. Sadler. Alcohol disrupts endoplasmic reticulum function and protein secretion in hepatocytes. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 36(1):14–23, January 2012.
- [42] Hidenori Ito, Ikuko Iwamoto, Yukata Inaguma, Takenori Takizawa, Kohichi Nagata, Tomiko Asano, and Kanefusa Kato. Endoplasmic reticulum stress induces the phosphorylation of small heat shock proteins, Hsp27. *Journal of Cellular Biochemistry*, 95(5):932–941, 2005.
- [43] Tomasz Kalwarczyk, Natalia Ziebach, Anna Bielejewska, Ewa Zaboklicka, Kaloian Koynov, Jędrzej Szymański, Agnieszka Wilk, Adam Patkoski, Jacek Gapiński, Has-Jürgen Butt, and Robert Holyst. Comparative analysis of viscosity of complex liquids and cytoplasm of mammalian cells at the nanoscale. *Nano Lett.*, 11:2157–2163, 2011.
- [44] G. Koch, M. Smith, D. Macer, P. Webster, and R. Mortara. Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasmic reticulum chaperonin. *J. Cell Sci.*, 86:217–232, 1986.
- [45] Michael C. Konopka, Irina A. Shkel, Scott Cayley, M. Thomas Record, and James C. Weisshaar. Crowding and confinement effects on protein diffusion *in vivo*. *J. Bacteriol.*, 188(17):6115–6123, Sept. 2006.
- [46] Michael C. Konopka, Kem A. Sochacki, Benjamin P. Bratton, Irina A. Shkel, M. Thomas Record, and James C. Weisshaar. Cytoplasmic protein mobility in osmotically stressed *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 191(1):231–237, January 2009.
- [47] Michael Kowarick, Stephanie Kung, Bruno Martoglio, and Ari Helenius. Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell*, 10:769–778, 2002.

- [48] Thomas Kühn, Teemu O. Ihalainen, Jari Hyvaäluoma, Nicolas Dross, Sami F. Willman, Jörg Langowski, Maija Vihinen-Ranta, and Jussi Timonen. Protein diffusion in mammalian cell cytoplasm. *PLOS ONE*, 6(8):1–12, 2011.
- [49] Chun Wei Lai, Deborah E. Aronson, and Erik Lee Snapp. BiP availability distinguishes states of homeostasis and stress in the endoplasmic reticulum of living cells. *Mol. Biol. Cell*, 21:1909–1921, June 15 2010.
- [50] Iphigenie Lang, Manfred Scholz, and Reiner Peters. Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells. *J. Cell Biol.*, 102:1183–1190, April 1986.
- [51] Fu-Cheng Liang, Umesh K. Bageshwar, and Siegfried M. Musser. Bacterial Sec protein transport is rate-limited by precursor length: a single turnover study. *Mol. Biol. Cell*, 20:4256–4266, October 1 2009.
- [52] Jennifer Lippincott-Schwartz, Erik Snapp, and Anne Kenworthy. Studying protein dynamics in living cells. *Mol. Cell Biol.*, 2:444–456, June 2001.
- [53] Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Anthony Brestcher, Hidde Ploegh, and Paul Matsudaira. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, sixth edition edition, 2007.
- [54] Harvey Lodish, Arnold Berk, Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, S. Lawrence Zipurski, and James Darnell. *Biología Celular y Molecular*. Editorial Medica Panamericana, quinta edition, 2005.
- [55] G. Luna-Barcena, Gerald E. Bennett, Issac C. Sanchez, and Keith P. Johnston. Monte Carlo simulation of polymer chain collapse in athermal solvents. *J. Chem. Phys.*, 104(24):9971–9973, 1996.
- [56] Darryl R. J. Macer and Gordon L. E. Koch. Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.*, 91:61–70, 1988.
- [57] Joseph Macri and Khosrow Adeli. Studies on intracellular translocation of apolipoprotein B in a permeabilized HepG2 system. *J. Biol. Chem.*, 272(11):7328–7337, 1997.
- [58] Jyoti D. Malhotra and Randal J. Kaufman. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 18(6):716–731, 2007.
- [59] James H. Marden and Lee R. Allen. Molecules, muscles and machines: universal performance characteristics of motors. *PNAS*, 99(7):4161–4166, April 2 2002.

- [60] Andrea M. Mastro, Michael A. Babich, William D. Taylor, and Alec D. Keith. Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3414–3418, June 1984.
- [61] Andreas Matouschek. Protein unfolding — an important process *in vivo*? *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 13:98–109, 2003.
- [62] Jacek T. Mika and Bert Poolman. Macromolecule diffusion and confinement in prokaryotic cells. *Curr. Opin. Biotech.*, 22:117–126, 2010.
- [63] Smita Mukherjee, Matthias M. Waegelé, Pramit Chowhury, Lin Guo, and Feng Gai. Effect of macromolecular crowding on protein folding dynamics at the secondary structure level. *J. Mol. Biol.*, 393:227–236, 2009.
- [64] M. Muthukumar. Polymer translocation through a hole. *J. Chem. Phys.*, 111(22):10371–10374, 1999.
- [65] Kunio Nakatsukasa and Jeffrey L. Brodsky. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic*, 9:861–870, 2008.
- [66] Daisuke Nawa, Osamu Shimada, Norihito Kawasaki, Naoki Matsumoto, and Kazuo Yamamoto. Stable interaction of the cargo receptor VIP36 with molecular chaperon BiP. *Glycobiology*, 17(9):913–921, 2007.
- [67] Perttu S. Niemelä, Samuli Ollila, Marja T. Hyvönen, Mikko Karttunen, and Ilpo Vattulainen. Assessing the nature of lipid raft membranes. *PLoS Computational Biology*, 3(2 e34):0304–0312, 2007.
- [68] Luis Olivares-Quiroz. Thermodynamics of ideal proteinogenic homopolymer chains as a function of the energy spectrum  $E$ , helical propensity  $\omega$  and enthalpic energy barrier. *J. Phys.: Condens. Mat.*, 25:155103, 2013.
- [69] Eran Or, Dana Boyd, Stéphanie Gon, Jonathan Beckwith, and Tom Rapoport. The bacterial ATPase SecA functions as a monomer in protein translocation. *J. Biol. Chem.*, 280(10):9097–9105, March 11 2005.
- [70] Andrew R. Osborne, Tom A. Rapoport, and Bert van der Berg. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21:529–550, 2005.
- [71] Simon Papadopoulos, Klaus D. Jurgens, and Gerolf Gros. Diffusion of myoglobin in skeletal muscle cells – dependence on fibre type, contraction and temperature. *Pflugers Arch.- Eur. J. Physiol.*, 430:519–525, 1995.
- [72] Simon Papadopoulos, Klaus D. Jurgens, and Gerolf Gros. Protein diffusion in living skeletal muscle fibers: dependence on protein size, fiber type, and contraction. *Biophys J.*, 79:2084–2094, 2000.

- [73] Effrosyni Papanikou, Spyridoula Karamanou, and Anastassios Economou. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat. Rev.: Microbiol.*, 5:839–851, 2007.
- [74] Eunyong Park and Tom A. Rapoport. Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu. Rev. Biophys.*, 41:21–40, 2012.
- [75] José Antonio Vélez Pérez, Orlando Guzmán, and Fernando Navarro-García. Steric contribution of macromolecular crowding to the time and activation energy for preprotein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Phys. Rev. E*, 88(1):012725–(1–15), July 2013.
- [76] Gregory A. Petsko and Dagnar Ringe. *Protein Structure and Function*. New Science Press Ltd, 2004.
- [77] Robert A. Pierotti. A scaled particle theory of aqueous and nonaqueous solutions. *Chem. Rev.*, 76(6):717–726, 1976.
- [78] Sergey Popov and Mu ming Poo. Diffusional transport of macromolecules in developing nerve processes. *J. Neurosci.*, 12(1):77–85, January 1992.
- [79] William S. Price, Philip W. Kuchel, and Bruce A. Cornell. Microviscosity of human erythrocytes studied with hypophosphite and  $^{31}\text{P}$ -NMR. *Biophys. Chem.*, 33:205–215, 1989.
- [80] Peters R. Nucleo-cytoplasmic flux and intracellular mobility in single hepatocytes measured by fluorescence microphotolysis. *EMBO J.*, 3(8):1831–1836, 1984.
- [81] Tom A. Rapoport. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature Reviews*, 450(29):663–669, 2007.
- [82] H. Reiss, H. L. Frisch, and J. L. Lebowitz. Statistical mechanics of rigid spheres. *J. Chem. Phys.*, 31(2):369–380, 1959.
- [83] Howard Reiss, H. L. Frisch, E. Helfrand, and J. L. Lebowitz. Aspects of the statistical thermodynamics of real fluids. *J. Chem. Phys.*, 32(1):119–124, 1960.
- [84] Peter M. Richards. Diffusion and trapping at arbitrary trap size and concentration. *J. Chem. Phys.*, 85(6):3520–3529, 1986.
- [85] Peter M. Richards. Diffusion to finite-size traps. *Phys. Rev. Letters*, 56(17):1838–1841, 1986.
- [86] Paolo De Los Rios, Anat Ben-Zvi, Olga Slutsky, Abdussalam Azem, and Pierre Goloubinoff. Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *PNAS*, 103(16):6166–6171, April 18 2006.

- [87] Hannes Risken. *The Fokker–Planck Equation*. Springer-Verlag, 1989.
- [88] Michelle L. Rowe, Lloyd W. Ruddock, Geoff Kelly, Jürgen M. Schmidt, Richard A. Williamson, and Mark J Howard. Solution structure and dynamics of ERp18, a small endoplasmic reticulum resident oxidoreductase. *Biochemistry*, 48:4596–4606, 2009.
- [89] Ivo F. Sbalzarini, Anna Mezzacasa, Ari Helenius, and Petros Koumoutsakos. Effects of organelle shape on fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J.*, 89(3):1482–1492, September 2005.
- [90] Gabriel Schlenstedt, Gudmundur H. Gudmundsson, Hans G. Boman, and Richard Zimmerman. Structural requirements for transport of preprocecropin A and related presecretory proteins into mammalian microsomes. *J. Biol. Chem.*, 267(34):22328–24332, December 5 1992.
- [91] Sandford M. Simon, Charles S. Peskin, and George F. Oster. What drives the translocation of proteins? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(3770-3774), May 1992.
- [92] Roberto Sitia and Ineke Braakman. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*, 426:891–894, 2003.
- [93] Erik L. Snapp, Ajay Sharma, Jeniffer Lippincott-Schwartz, and Ramanujan S. Hegde. Monitoring chaperone engagement of substrates in the endoplasmic reticulum of live cells. *PNAS*, 103(17):6536–6541, April 25 2006.
- [94] Alexandra Stolz and Dieter H. Wolf. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim. Biophys. Acta*, 1803:694–705, 2010.
- [95] Gerda Suchanek, Gunter Kreil, and Mark A. Hermodson. Amino acid sequence of honeybee prepromelittin synthesized *in vitro*. *Biochemistry*, 75(2):701–704, 1978.
- [96] W. Sung and P. J. Park. Polymer translocation through a pore in a membrane. *Physical Review Letters*, 77(4):783–786, 1996.
- [97] R. Swaminathan, Cathy P. Hoang, and A. S. Verkman. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophys. J.*, 72:1900–1907, 1997.
- [98] Richard H. Templer, Saffron J. Castle, A. Rachael Curran, Garry Rumbles, and David R. Klug. Sensing isothermal changes in the lateral pressure in model membranes using di-pyrenyl phosphatidylcholine. *Faraday Discuss.*, 111:41–53, 1998.

- [99] Friederike Thor, Matthias Gautschi, and Roger Geinerand Ari Helenius. Bulk flow revisited: transport of a soluble protein in the secretory pathway. *Traffic*, 10:1819–1830, 2009.
- [100] Richard C. Tolman. The effect of droplet size on surface tension. *J. Chem. Phys.*, 17(3):333–337, 1949.
- [101] Danuta Tomkiewicz, Nico Nouwen, Ruud van Leeuwen, Sander Tans, and Arnold J. M. Driessen. SecA supports a constant rate of preprotein translocation. *J. Biol. Chem.*, 281(23):15709–15713, 2006.
- [102] M. v. Smoluchowski. Versuch einer mathematischen theorie der koagulationskinetik kolloider lösungen. *Phys. Z.*, 17, 1916.
- [103] B. van der Berg. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.*, 18:6927–6933, 1999.
- [104] Bert van der Berg, William M. Clemons Jr, Ian Collinson, Yorgo Modis, Enno Hartmann, Stephen C. Harrison, and Tom A. Rapoport. X-ray structure of a protein-conducting channel. *J. Cell Biol.*, 427:36–44, 2003.
- [105] Paul van der Schoot. Protein-induced collapse of polymer chains. *Macromol.*, 31(4635-4638), 1998.
- [106] N. G. van Kampen. Diffusion in inhomogeneous media. *Z.Phys. B - Condensed Matter*, 68:135–138, 1987.
- [107] William Wickner and Randy Schekman. Protein translocation across biological membranes. *Science*, 310:1452–1456, 2005.
- [108] John W. Wojcieszyn, Robert A. Schlegel, En-Shinn Wu, and Kenneth A. Jacobson. Diffusion of injected macromolecules within the cytoplasm of living cells. *PNAS USA*, 78(7):4407–4410, 1981.
- [109] Inc. Wolfram Research. Computer program *MATHEMATICA*. *Champaign, IL.*, 2010.
- [110] Chenye Xing, O. H. Samuli Ollila, Ilpo Vattulainen, and Rolland Faller. Asymmetric nature of lateral pressure profiles in supported lipid membranes and its implications for membrane protein functions. *Soft Matter*, 5:3258–3261, 2009.
- [111] Chao-Yuh Yang, Fu-Shin Lee, Lawrence Chan, Doris A. Sparrow, James T. Sparrow, and Antonio M. Gotto Jr. Determination of the molecular mass of apolipoprotein B-100: a chemical approach. *Biochem. J.*, 239:770–780, 1986.
- [112] Zemin Yao, Khai Tran, and Roger S. McLeod. Intracellular degradation of newly synthesized apolipoprotein B. *J. Lipid Res.*, 38:1937–1953, 1997.

- [113] Bin Zhang and III Thomas F. Miller. Direct simulation of early-stage Sec-facilitated protein translocation. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(33):13700–13707, 2012.
- [114] Huan-Xiang Zhou. Loops, linkages, rings, catenates: entropy-based strategies for stabilizing proteins. *Acc. Chem. Res.*, 37(2):123–130, 2004.
- [115] Jochen Zimmer, Yunsun Nam, and Tom A. Rapoport. Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature*, 455:936–945, October 16 2008.
- [116] R. Zimmerman, M. Sagstetter, G. Schlenstedt, H. Wiech, B. Kasseckert, and G. Muller. *Membrane Biogenesis: Import of small secretory and plasma membrane proteins into the endoplasmic reticulum*. Springer-Verlag, 1988.
- [117] Richard Zimmerman, Maria Sagstetter, Gabriel Schlenstedt, Hans Wiech, Birgitta Kabeckert, and Günter Müller. Import of small secretory and plasma membrane proteins into the endoplasmic reticulum. In Jos A. F. Op den Kamp, editor, *Membrane Biogenesis*, volume H16, pages 337–350. Springer-Verlag, 1988.
- [118] S. B. Zimmerman and Stefan O. Trach. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 222(590-622), 1991.
- [119] G. Zumofen and A. Blumen. Random-walk studies of excitation trapping in crystals. *Chem. Phys. Lett.*, 88(1):63–67, 1982.
- [120] Gert Zumofen and Alexander Blumen. Energy transfer as a random walk. II. Two-dimensional regular lattice. *J. Chem. Phys.*, 76(1):3713–3719, 1 Apr. 1982.