



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Identificación y caracterización de la proteína BI-ARC y
su posible papel en el mecanismo de pupilación en
Bifidobacterium longum subsp. *infantis*”**

Tesis que presenta
Mabel Guzmán Rodríguez

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dra. Martha Leticia Santos Martínez

San Luis Potosí, S.L.P., Marzo del 2015



Constancia de aprobación de la tesis

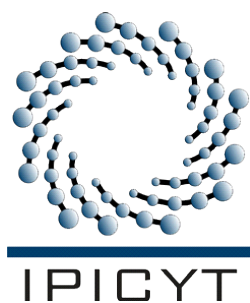
La tesis ***"Identificación y caracterización de la proteína BI-ARC y su posible papel en el mecanismo de pupilación en Bifidobacterium longum subsp. infantis"*** presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mabel Guzmán Rodríguez** y aprobada el veinte y seis de marzo del dos mil quince por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Directora de la tesis

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Ulises Meza Villanueva
Miembro del Comité Tutorial



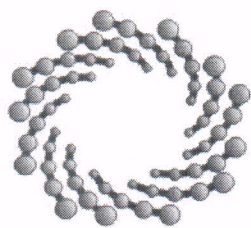
Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección (codirección) de la Dra. Martha Leticia Santos Martínez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 263350) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Agradecimiento al CONACyT por el apoyo al proyecto: Análisis estructural y funcional de nuevos complejos proteínicos asociados a la familia de ATPasas AAA en *Bifidobacterium longum*. Convocatoria de Investigación Científica Básica 2008, CONACYT. Proyecto no. 101568.

Agradecimiento por el apoyo para los datos de movilidad iónica a CONACYT-MEXICO GRANT 56787 (Laboratory for Nanoscience and Nanotechnology Research-LINAN), INFRA-2013-01 No. 204373



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 075 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 26 días del mes de marzo del año 2015, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Presidenta	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Secretario	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Sinodal	IPICYT
Dr. Ulises Meza Villanueva	Sinodal externo	UASLP

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Mabel Guzmán Rodríguez

sobre la Tesis intitulada:

*Identificación y caracterización de la proteína BI-ARC y su posible papel en el mecanismo de
pupulación en Bifidobacterium longum subsp. infantis*

que se desarrolló bajo la dirección de

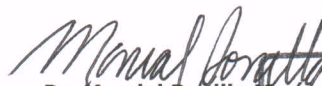
Dra. Martha Leticia Santos Martínez

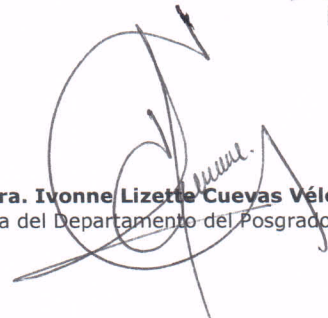
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:56 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 26 días del mes de marzo de 2015.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Agradecimientos

A la Dra. Leticia Santos por asesorarme a lo largo de este trabajo que culmina con el presente proyecto.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, Dr. Samuel Lara y el Dr. Ulises Meza por sus consejos durante este trayecto.

A Alberto Barrera y Gabriel Ordoñez por el apoyo y disponibilidad durante mi estancia en el laboratorio.

A CONACyT por el apoyo con la beca 263350 y al IPICyT por la oportunidad de permitir el desarrollo personal y profesional.

A mis Padres por ser los mejores y estar conmigo incondicionalmente.

A mis hermanos Nubia y Jorge con los que aprendí que después de la tempestad viene la calma.

A Néstor que sin duda a caminado a mi lado durante estos años.

A mis amigos y compañeros de laboratorio gracias por estar conmigo, aconsejarme, regañarme, compartir risas y llantos en todo este tiempo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de Tablas	x
Lista de Figuras	xi
Anexos	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xvi
1. Introducción	1
1.1 <i>Bifidobacterium longum</i> como modelo de estudio	1
1.2 Sistema de control de calidad de proteínas.....	4
1.3 Complejos Chaperonas/Proteasas en la degradación de proteínas.....	5
1.4 Degradación de proteínas por pupilación	7
1.5 Reconocimiento y desdoblamiento de sustratos por las ATPasas durante la degradación de proteínas.	11
1.6 Objetivos	13
2. Materiales y métodos	14
2.1 Bioinformática	14
2.2 Análisis del proteoma de <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> con el software iPup	14
2.3 Amplificación del gen <i>blon_2125 (pup)</i>	14
2.4 Clonación en sistema TOPO 4	15
2.5 Subclonación en el vector de expresión pET 28a+.....	15
2.6 Transformación	15
2.7 Minipreparaciones	16

2.8 Expresión heteróloga	16
2.9 Purificación por columnas de afinidad de Ni ⁺²	17
2.10 Western blot.....	17
2.11 Espectrometría de masas.....	17
2.12 Caracterización de la actividad de ATPasa	18
2.13 Dicroísmo circular	18
2.14 Coinmunoprecipitaciones	18
3. Resultados y discusión.....	20
3.1 Estudio de la proteína BI-ARC en <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	20
3.1.1 Análisis bioinformático de la proteína BI-ARC.....	20
3.1.2 Expresión y purificación de la proteína BI-ARC	24
3.1.3 Caracterización de la actividad ATPasa.....	26
3.1.4 Espectrometría de masas	29
3.1.5 Modelado en 3D	30
3.2 Análisis de la proteína Pup en <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	35
3.2.1 Análisis de la secuencia de Pup.....	35
3.2.2 Amplificación y clonación del gen <i>blon_2125</i>	36
3.2.3 Expresión heteróloga de Pup	37
3.2.4 Dicroísmo circular	38
3.2.5 Modelado en 3D	40
3.2.6 Coinmunoprecipitaciones	42
3.3 Dop y PafA proteínas accesorias del sistema de pupilación en <i>B. longum</i>	44
3.3.1 Alineamientos y estructuras secundarias de Dop y PafA.....	44
3.3.2 Características estructurales de las proteínas Dop y PafA	49

3.3.3 Modelo de unión al ATP y sitio activo de Dop y PafA	52
3.4 Predicción de Pupilación en <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	55
3.4.1 Identificación de proteínas susceptibles de pupilación en el proteoma completo de <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	55
4. Conclusiones	66
5. Referencias	69

Lista de Tablas

Tabla 1. Productos comerciales que contienen <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	2
Tabla 2. Actividad de BI-ARC con distintos compuestos en presencia de ATP.....	26
Tabla 3. Actividad de BI-ARC en presencia de inhibidores	28
Tabla 4. Porcentajes de identidad y similitud entre proteínas Pup.	37
Tabla 5. Porcentajes de identidad y similitud entre proteínas Dop.	46
Tabla 6. Porcentajes de identidad y similitud entre proteínas PafA.....	46
Tabla 7. Aminoácidos conservados en las proteínas Dop y PafA	54
Tabla 8. Puntajes para determinar los sitios de pupilación.....	56
Tabla 9. Proyecto de secuenciación de <i>B. longum</i>	57
Tabla 10. Pupiloma en <i>B. longum</i>	60

Lista de Figuras

Figura 1. Proteólisis mediada por chaperonas/proteasas.....	5
Figura 2. Chaperonas y proteasas presentes en <i>B. longum</i>	6
Figura 3. Pupilación	8
Figura 4. Organización genómica de los genes que participan en el mecanismo de pupilación.....	10
Figura 5. Organización genómica de <i>arc</i> , <i>dop</i> , <i>pup</i> y <i>pafA</i> en <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	11
Figura 6. Reconocimiento, desdoblamiento y degradación de sustratos en actinobacterias.....	12
Figura 7. Mecanismo de las ATPasas en el desdoblamiento de sustratos	12
Figura 8. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína BI-ARC con miembros representativos de ATPasas proteosomales.	23
Figura 9. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas ARC.	24
Figura 10. Clonación, expresión y purificación de BI-ARC.	25
Figura 11. Actividad de la proteína BI-ARC en presencia de diferentes nucleótidos.	27
Figura 12. Cinética de Michaelis-Menten para BI-ARC.....	28
Figura 13. Secuencia de la proteína sobreexpresada, analizada por espectrometría de masas.	29
Figura 14. Espectro de ionización de la proteína BI-ARC, analizada por electrospray.	30
Figura 15. Modelo en listones de la estructura tridimensional de la proteína BI-ARC.	33
Figura 16. Modelado <i>in silico</i> del hexámero de la proteína BI-ARC.....	34
Figura 17. Alineamiento de proteínas Pup de diferentes especies de actinobacterias.....	35

Figura 18. Subclonación del ORF del gen <i>pup</i>	38
Figura 19. Expresión de la proteína Pup en <i>E. coli</i> BL21pLysS.	39
Figura 20. Espectros que muestran la tendencia al desorden de la proteína Pup.	41
Figura 21. Estructura secundaria y modelo en listones de la proteína Pup.....	42
Figura 22. Complejo formado entre Mpa y Pup.	43
Figura 23. Coinmunoprecipitaciones con extractos de células de <i>B. longum</i>	44
Figura 24. Alineamiento en secuencia de aminoácidos de PafA y Dop de miembros representativos de actinobacterias	44
Figura 25. Estructuras secundarias de las proteínas Dop y PafA de <i>B. longum</i> . ..	50
Figura 26. Modelado de estructuras de proteínas Dop en <i>B. longum</i>	52
Figura 27. Modelado de estructuras de proteínas PafA en <i>B. longum</i>	53
Figura 28. Clasificación de las proteínas blanco a ser pupiladas en <i>B. longum</i>	57
Figura 29. Esquema de pupilación propuesto para <i>B. longum</i>	67

Anexos

Anexo I. Protocolo purificación banda de ADN del gel de agarosa (Kit QIAgen)...	78
Anexo II. Protocolo limpieza de producto de PCR (Kit-QIAgen)	79
Anexo III. Células competentes	80
Anexo IV. Protocolo transformación	81
Anexo V. Extracción de ADN plasmídico (Kit QIAgen)	82
Anexo VI. Gel de agarosa al 1%.....	83
Anexo VII. Cuantificación de Proteína por el método de Bradford.....	84
Anexo VIII. Electroforesis de proteínas.....	85
Anexo IX. Western Blot.....	88
Anexo X. Purificación de proteína por columnas de afinidad (Ni-NTA)	91
Anexo XI. Ensayo enzimático con caseína como sustrato	93
Anexo XII. Actividad ATPasa	95
Anexo XIII. Publicaciones	96

Resumen

Identificación y caracterización de la proteína BI-ARC y su posible papel en el mecanismo de pupilación en *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

La administración oral de bifidobacterias promueve el mantenimiento de la flora intestinal en humanos lo que estimula la respuesta inmune y tiene efectos preventivos en cáncer. A pesar de estas características altamente relevantes, poco se sabe de los eventos moleculares en este organismo y la relación con su hospedero.

En nuestro laboratorio se estudian las funciones de las ATPasas de la familia AAA (ATPasas Associated with diverse cellular Activities). ATPasas AAA están involucradas en procesos celulares y moleculares clave en todos los organismos. En un estudio previo (trabajo de tesis de Maestría), localizamos el gen *IPR003593 AAA+ ATPase* en el genoma de *Bifidobacterium longum*, cuya secuencia codifica una proteína de 56.1 kDa con un dominio característico AAA. Análisis filogenético permitió posicionarla dentro del grupo ARC AAA y denominarla BI-ARC.

Alineamientos del dominio N-terminal de BI-ARC agrupó ATPasas que participan en la vía de degradación proteínica via proteosoma como ARC de *Rhodococcus erythropolis*, PAN de *Methanococcus jannaschii*, Mpa de *Mycobacterium tuberculosis* y la subunidad proteosomal Rpt1 de humano.

En la organización genómica de *B. longum*, *bl-arc* está flanqueado por un grupo de genes que incluyen a *pafA*, *pup* y *dop* involucrados en el procesamiento de sustratos en el mecanismo de pupilación. No obstante, ha sido descrito que *B. longum* carece de los genes que codifican las subunidades α y β proteosomales (*prcA* y *prcB*). Estas características hacen aún más interesante el estudio del procesamiento de degradación y/o control de calidad de proteínas.

Análisis estructurales preliminares de BI-ARC confirmaron la formación de un complejo molecular homo-hexamérico de 336 kDa. La caracterización enzimática evidenció además actividad ATPásica en presencia de Mg^{+2} y ATP y sensibilidad en presencia de *N*-etilmaleimida (típico de proteínas AAA).

Posteriormente se analizó la proteína Pup. Resultados del análisis de dicroísmo circular evidenciaron un patrón de desorden en su secuencia de aminoácidos; esta característica le confiere mayor flexibilidad para interactuar con otras proteínas para conducir las a degradación.

Análisis *in silico* de las proteínas Dop y PafA revelaron la conservación de sus estructuras y sitios clave contra proteínas ortólogas. Esto permitió la predicción de mecanismos basados en su estructura-función.

Finalmente realizamos una búsqueda bioinformática con el software iPUP para la predicción de posibles sitios de pupilación en el proteoma de *B. longum*. Encontramos tendencia a pupilación de proteínas que participan en el metabolismo celular.

Los datos generados en este trabajo de investigación sugieren la participación potencial de BI-ARC en la vía de marcaje de proteínas conocida como pupilación.

PALABRAS CLAVE. *Bifidobacterium longum*, probiótico, proteínas AAA, chaperona.

Abstract

Identification and characterization of BI-ARC and its possible role in the mechanism of pupylation in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

Oral administration of bifidobacteria improves intestinal flora in humans for stimulation of immune responses and possibly preventing cancer. Despite these relevant characteristics, information about molecular events is missing and the relationship along their host.

In our laboratory we are studying the function of AAA proteins (ATPases Associated with diverse cellular Activities). AAA ATPases are involved in key cellular and molecular processes in all the organisms. In a previous study (M. Sc. Thesis), we found the gene *IPR003593 AAA + ATPase core* in *Bifidobacterium longum* genome. This gene codes a protein of 56.1 kDa with an AAA ATPase domain. Phylogenetic analysis positioned this sequence into the ARC AAA branch and we named it as BI-ARC.

N-terminal alignments of BI-ARC grouped ATPases that participate in the degradation pathway via proteasome such as *Rhodococcus erythropolis* ARC, *Archaeoglobus fulgidus* PAN, *Mycobacterium tuberculosis* Mpa and the human proteasomal Rpt1 subunit.

In the genome organization of *B. longum*, *bl-arc* is flanked by a cluster of genes that include *pafA*, *pup* and *dop*, all involved in substrate processing via pupylation. It has been described that *B. longum* lack the α γ β proteosomal genes (*prcA* and *prcB*). This characteristic makes *B. longum* an attractive model to study the quality control of proteins and degradation processing.

Preliminary structure analyses of BI-ARC confirmed the formation of a homo-hexameric complex of 336 kDa. Enzymatic characterization showed BI-ARC as an active ATPase Mg^{2+} and ATP dependent, and sensitive against *N*-ethylmaleimide (typical of AAA proteins).

In addition, the Pup protein was analyzed by circular dichroism. Results showed an unruly pattern in its aminoacid sequence; this characteristic allows Pup to have flexibility to interact with other proteins and conduct them to degradation.

In silico analysis of Dop and PafA revealed their structure are highly conserved against orthologues. This allowed the prediction of mechanisms based on their structure-function.

Finally, we performed a bioinformatic search with the use of the iPUP software. This platform predicted the pupylation sites in *B. longum* proteome. We found a myriad of pupylated proteins with a tendency of proteins involved in cellular metabolism.

The data generated in this work strongly suggest the participation of BI-ARC in the protein substrate processing via pupylation.

KEY WORDS. *Bifidobacterium longum*, probiotic, AAA protein, chaperone

1. Introducción

1.1 *Bifidobacterium* como modelo de estudio

La microflora intestinal está compuesta por cientos de especies de bacterias que pueden ser benéficas o perjudiciales a los humanos (Luckey 1972). El equilibrio entre especies puede verse perturbado por una diversidad de causas, como la toma de antibióticos, el estrés, el envejecimiento ó la dieta, en estos casos la salud del intestino puede verse alterada.

Los microorganismos relacionados con efectos benéficos en la salud del hospedero, son denominados probióticos. Los probióticos pueden encontrarse en productos alimenticios o suplementos, estos productos contienen microorganismos vivos cuyo consumo en cantidades suficientes pueden ser benéficos para la salud (Joint FAO/WHO Working Group, 2002). Entre los géneros más comunes de bacterias probióticas que se encuentran en el intestino están las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Holzapfel *et al.* 1998; Picard *et al.* 2005).

Uno de los géneros más abundantes en el tracto gastrointestinal lo constituyen las bifidobacterias, que son bacterias Gram positivas no mótils, no formadoras de esporas, no producen gas en los cultivos, son anaerobias y tienen un alto contenido de G-C en su secuencia de ADN (55 al 67%) (Ventura *et al.* 2009; Klijn *et al.* 2006). Su morfología hace referencia a la formación de estructuras bifurcadas irregulares.

Bifidobacterium longum fue de las primeras especies que se aislaron, los primeros cultivos se obtuvieron de las heces fecales de niños y, a partir de entonces se ha relacionado su presencia a una buena salud intestinal en humanos (Tissier, 1900). Numerosos trabajos científicos atribuyen a las bifidobacterias importantes beneficios a la salud, entre estos efectos benéficos destacan:

- Cambios en la composición de la microflora intestinal en personas mayores (Akatsu *et al.* 2013).
- Tratamiento del síndrome del colon irritable (Ringel-Kulka *et al.* 2011;

Brenner and Chey 2009; Hosseini *et al.* 2012).

- Se ha visto que evitan diarrea provocada por la administración de antibióticos (Allen *et al.* 2013; de Vrese *et al.* 2005).
- Se ha señalado que pueden actuar en la prevención del cáncer de colon (Reddy 1998; Singh *et al.* 1997; McIntosh 1996).
- Estimulan el sistema inmunitario (Trushina *et al.* 2006; Groeger *et al.* 2013; You and Yaqoob 2012).
- Reducen síntomas en alergias (Singh *et al.* 2013).

Actualmente los probióticos se encuentran en productos lácteos fermentados ó están presentes en suplementos en forma de pastillas, cápsulas y sobres. En la Tabla 1 se ejemplifican algunos productos comerciales que en su formulación contienen *B. longum* subsp. *infantis*.

Tabla 1. Productos comerciales que contienen <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>			
Nombre del producto	Tipo de producto	Industria	Microorganismos
Digestive Probiotic®	Farmacéutico	CVS Pharmacy http://www.cvs.com/shop/health-medicine/digestive-health/probiotics/cvs-probiotic-caplets-skuid-460442	<i>B. infantis</i>
If flora Multi-Probiotic Formula®	Farmacéutico	Sedona Labs http://www.sedonalabs.com/iflora-multi-probiotic-capsules	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. lactus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Life Start 2®	Farmacéutico	Natren http://www.kelatox.com/Life%20Start%202	<i>B. infantis</i>
Nexabiotic®	Farmacéutico	Bioprospan Labs	<i>S. boulardi</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L.</i>

		http://nexabiotic.com/order-now/	<i>fermentum, L. acidophilus, L. brevis, L. bulgaricus, L. casei, L. helveticus, L. paracasei, L. plantarum, L. rhamnosus, L. salivarius, L. lactis, B. coagulans, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. lactis, B. longum, P. acidilacti</i>
Probiotic GI Tract®	Farmacéutico	New Chapter http://www.iherb.com/New-Chapter-Probiotic-GI-Tract-90-Veggie-Caps-Discontinued-Item/4682	<i>S. thermophilus, L. casei, L. plantarum, L. salivarius, L. acidophilus, L. rhamnosus, B. bifidum, B. infantis, B. longum, B. breve</i>
Probiotics Ultra®	Farmacéutico	Syontix http://gutcritters.com/alternatives-to-gutcritters-probiotics-ultra/	<i>L. acidophilus, L. casei, L. plantarum, L. reuteri, L. rhamnosus, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. longum, L. helveticus</i>
Super 10 Probiotic Complex®	Farmacéutico	GNC http://www.gnc.com/GNC-Multi-Strain-Probiotic-Complex-10-Billion-CFUs/product.jsp?productId=24191136	<i>L. salivarius, L. rhamnosus, B. bifidum, B. longum, B. infantis, L. acidophilus, B. lactis</i>
Ultimate Flora Critical Colon®	Farmacéutico	Renew Life http://www.amazon.com/Renew-Life-Ultimate-Critical-Capsules/dp/B003BVL05O	<i>B. lactis, B. bifidum, B. breve, B. lactis, B. longum, B. infantis, L. acidophilus, L. casei, L. plantarum, L. paracasei, L. salivarius, L. rhamnosus, L. bulgaricus, L. gasseri</i>
Ultimate Flora Ultra Potent®	Farmacéutico	Renew Life http://www.renewlife.com/ultimate-flora-ultra-potent-100-billion.html	<i>B. lactis, B. breve, B. longum, B. longum, B. infantis, L. acidophilus, L. casei, L. plantarum, L. paracasei, L. salivarius, L. rhamnosus</i>
VSL # 3®	Farmacéutico	Sigma Tau Pharmaceuticals http://shop.vsl3.com/vsl3---30-pack-regular-p3.aspx	<i>B. breve, B. longum, B. infantis, L. acidophilus, L. plantarum, L. paracasei, L. bulgaricus, S. thermophilus</i>

Los beneficios que aportan estos microorganismos a la salud en humanos están documentados por varios grupos de investigación. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se alcanzan estos efectos aun son desconocidos. Por ello, es necesario el estudio de las proteínas y su participación dentro de los procesos celulares, para elucidar los mecanismos que ocurren en estos organismos y durante la interacción con los hospederos.

1.2 Sistema de control de calidad de proteínas

Henry Borsook y Rudolf Schoenheimer demostraron que los componentes proteínicos de los seres vivos se recambian constantemente, esto es síntesis y degradación de proteínas (Borsook 1934) (Schoenheimer 1939). Este mecanismo de regulación en las células permite su adaptación frente a cambios ambientales o diversas necesidades metabólicas (Frees et al. 2004).

Para conseguir con éxito la producción de proteínas funcionales, es necesario que los polipéptidos generados en el ribosoma se ensamblen de manera que su estructura tridimensional sea estable y, que esta conformación se mantenga a través de su vida media para el mantenimiento de la homeostasis celular; este control de calidad en la función y estructura de las proteínas recae en el buen funcionamiento de las chaperonas y proteasas celulares (Wickner *et al.* 1999).

Las chaperonas promueven el plegado correcto de proteínas y evitan que se formen agregados proteínicos insolubles (Hoskins et al. 1998). Mientras que las proteasas se encargan de eliminar proteínas que han sido plegadas incorrectamente, han cumplido su función o han sido dañadas de manera irreversible (Jennings et al. 2008).

Además de promover el plegado de proteínas, algunas chaperonas forman complejos con proteasas para desdoblar proteínas que no son funcionales y promueven su degradación. Durante este proceso estas proteínas hidrolizan ATP para llevar a cabo sus funciones (Snider y Houry 2008; Singh et al. 1999).

En eucariontes una de las vías principales de degradación proteolítica es el mecanismo de ubiquitinación, en arqueas el sistema es conocido como

sampilación y en bacterias, hasta hace algunos años, solo se conocía un sistema cooperativo entre chaperonas y proteasas distintas a proteosoma (ej, ClpXP) (Flynn *et al.* 2003) (Gur and Sauer 2008). Sin embargo, en los últimos años se ha descrito que algunas actinobacterias poseen los genes *pcrA* y *pcrB* (subunidades α y β proteasomales) los cuales participan en la degradación de proteínas en el mecanismo de pupilación (Iyer *et al.* 2008).

1.3 Complejos chaperonas-proteasas en la degradación de proteínas

En bacterias como se ha mencionado, el proceso de degradación de proteínas es realizado por conjuntos de chaperonas y proteasas dependientes de ATP. Uno de los complejos chaperona-proteasa mejor caracterizado es el conformado por las enzimas ClpA (chaperonas hexaméricas) y por las enzimas ClpP (proteasas heptaméricas) (Singh *et al.* 1999).

El complejo ClpAP forma una estructura en forma de barril hueco con un diámetro interno de ~ 45 Å. Las proteínas blanco son reconocidas por la chaperona la cuál promueve el desplegamiento (disrupción de la estructura terciaria de las proteínas sustrato) y su conducción hacia la región proteolítica de la proteasa, para conseguir finalmente su degradación (Figura 1).

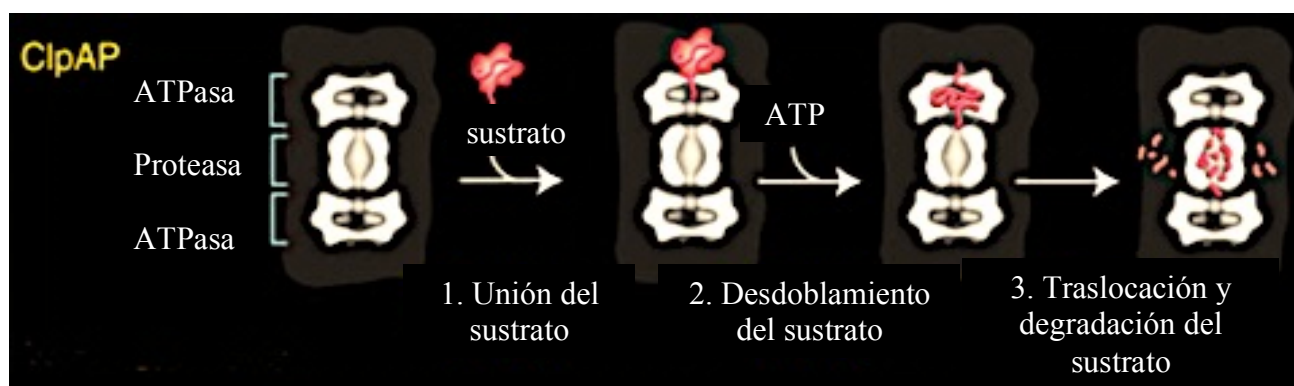


Figura 1. Proteólisis mediada por chaperonas/proteasas (Modificado de Wickner *et al.* 1999).

Además de los complejos Clp-chaperona, se han descrito las proteínas FtsH (Langklotz et al. 2012) y Lon (Van Melderen and Aertsen 2009) como proteínas que participan en la degradación de sustratos. Estos sistemas de degradación reconocen las proteínas que fueron marcadas por pequeñas secuencias de aminoácidos presentes en sus dominios N- o C- terminal; estas prolongaciones pueden formar parte de la estructura primaria de la proteína (Flynn *et al.* 2003) (Gur and Sauer 2008) ó pueden ser agregados en forma de etiqueta; por ejemplo, la adición de 11 aminoácidos (ssrA-tag- small stable RNA A) durante la síntesis de la proteína en el ribosoma (Varshavsky 1996) (Erbse *et al.* 2006).

Estas etiquetas pueden ser reconocidas directamente por las chaperonas ó pueden intervenir proteínas adaptadoras. Estas proteínas adaptadoras pueden unir simultáneamente a la chaperona y a la proteína sustrato para promover el desdoblamiento y degradación. Un ejemplo de estas proteínas adaptadoras es SspB; que incrementa la afinidad de ClpXP por la etiqueta ssr-A de las proteínas marcadas (Levchenko *et al.* 2000). Otro ejemplo es la proteína ClpS permite al complejo ClpAP reconocer y degradar sustratos marcados (N-end rule) (Erbse *et al.* 2006).

Sugimoto y Sonomoto en 2011 describieron la presencia en *Bifidobacterium longum* de las chaperonas ClpC, ClpX, las chaperoninas DnaK/DnaJ/GrpE, el complejo GroEL/GroES y proteasas como ClpP, FtsH y Lon (Figura 2), que son las que estarían interviniendo en la regulación de los componentes proteínicos celulares.

Bacterias	Proteínas Clp						FtsH	Lon	
	ATPasas					Proteasas			
	ClpA	ClpC	ClpE	ClpX	ClpY	ClpP			ClpQ
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0	1	0	1	0	2	0	1	1
<i>Bifidobacterium longum</i>	0	1	0	1	0	2	0	1	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0	1	2	1	1	1	1	1	0
<i>Lactobacillus Brevis</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lactobacillus casei</i>	0	1	1	1	1	2	1	1	1

Figura 2. Chaperonas y proteasas presentes en *B. longum*. Modificado de Sugimoto y Sonomoto 2011.

1.4 Degradación de proteínas por el mecanismo de pupilación

El proteosoma en actinobacterias participa en el mecanismo de degradación de proteínas denominado pupilación; que permite que los sustratos marcados sean reconocidos y degradados.

Algunos de los géneros que presentan genes que codifican las subunidades del proteosoma 20S son: *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Frankia* y *Mycobacterium* (Zhang *et al.* 2004).

En la pupilación, una pequeña proteína llamada Pup etiqueta a las proteínas sustrato que serán degradadas. El gen que la codifica, se localiza cercano a la región 5' río-arriba donde se encuentran los genes de las subunidades del proteosoma. Es importante resaltar que la proteína Pup no posee homología con la secuencia de la ubiquitina (Striebel *et al.* 2009).

El mecanismo de pupilación se inicia con la enzima Dop, que deamida a Pup en un residuo de glutamina localizado en el motivo conservado (GGQ) en la región C-

terminal (Pearce *et al.* 2008). Una vez catalizada esta reacción, la proteína PafA (perteneciente a la familia de las proteínas carboxilato-amino/amonio ligasas) (Iyer *et al.* 2008) cataliza la formación de un enlace isopeptídico entre la lisina de la proteína blanco y el glutamato de la región C-terminal de Pup (Striebel *et al.* 2009). Recientemente también se ha descrito que la proteína Dop permite el reciclado de las proteínas Pup una vez que han conducido a degradación los sustratos (Burns *et al.* 2010).

El paso final es el reconocimiento de la proteína Pup por el dominio “coiled-coil” de la chaperona ARC para promover la degradación del sustrato vía proteosoma. Estas estructuras “coiled-coil” entran en contacto con la región central de la proteína Pup (residuos 22-63) y dejan libre el resto de la región N-terminal (Sutter *et al.* 2009) (Figura 3).

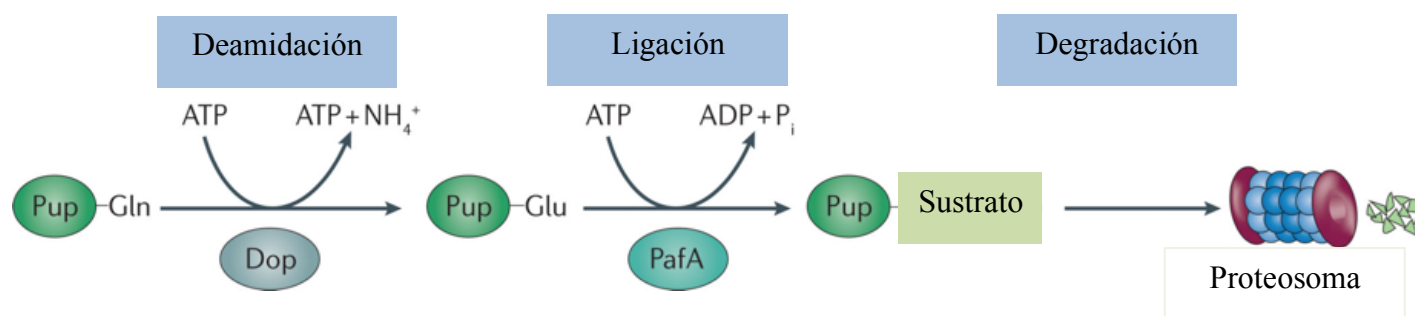


Figura 3. Pupilación (Modificado de Maupin-Furrow 2012).

La presencia de estas estructuras “coiled-coil” son imprescindibles en las proteínas ARC, ya que deleciones de estas regiones en la enzima reflejan una deficiencia en el reconocimiento de las proteínas Pup y, por consiguiente, también en el desdoblamiento de proteínas (Sutter *et al.* 2009).

Además, se ha observado que a diferencia de la ubiquitinación en la pupilación no es necesaria la formación de cadenas poliméricas de proteínas Pup para que puedan ser reconocidas por las chaperonas (Pearce *et al.* 2008; Burns y Darwin 2012).

Como se ha venido describiendo, una parte fundamental durante el proceso de pupilación es la participación de las proteínas chaperonas ARC/Mpa (homólogas a las ATPasas AAA Rpt y PAN descritas en eucariontes y arqueas, respectivamente) (Striebel *et al.* 2010; Tomko y Hochstrasser 2011; Zwickl *et al.* 1999).

Estas chaperonas ARC/Mpa pertenecen a la superfamilia de proteínas AAA (ATPasas Associated with diverse cellular Activities), las cuales presentan un dominio altamente conservado (Swaffield y Purugganan 1997). Dicho dominio está formado por una región de 200 a 250 aminoácidos, con tres motivos característicos, 1) Walker A (Reconoce el sustrato ATP), 2) Walker B (Unión al cofactor Mg^{2+}), 3) una segunda región de homología responsable de la unión de ATP e hidrólisis (Walker *et al.* 1982). Estas proteínas se ensamblan formando oligómeros que pueden formar estructuras anilladas con un poro central y utilizan ATP, lo que les permite modificar sus estados conformacionales, produciendo una remodelación del sustrato blanco (Vale 2000; Martin *et al.* 2005).

En los genomas de actinobacterias los genes que codifican las proteínas ARC se encuentran agrupados de manera muy conservada con genes de proteínas que participan en la pupilación (*arc/mpa*, *dop*, *pup*, *prcA*, *prcB* y *pafA*) (Figura 4).

Existen algunos organismos como *Leptospirillum ferrooxidans* que contienen dos copias del sistema completo (L1-L2), que son iguales en términos del contexto genético, pero muy distintos en sus secuencias. La proteína Pup en L2 carece del motivo GGE, que es necesario para que ocurra el enlace con las proteínas blanco; por lo que cabe la posibilidad de que participe de manera distinta a lo ya descrito.

En el caso particular del genoma de *B. longum* subsp. *infantis* están presentes los genes *pup*, *arc*, *dop* y *pafA* (Figura 5). Sin embargo, no posee los genes *prcA* y *prcB* (subunidades proteosomales). Análisis filogenéticos revelan que los organismos carentes de los genes *prcA* y *prcB* se agrupan en un clado distinto al de bacterias que poseen los seis genes (*arc/mpa*, *dop*, *pup*, *prcA*, *prcB* y *pafA*) (Figura 4).

El estudio de este mecanismo novedoso en *B. longum*, puede aportar información relevante en su papel en la degradación de proteínas.

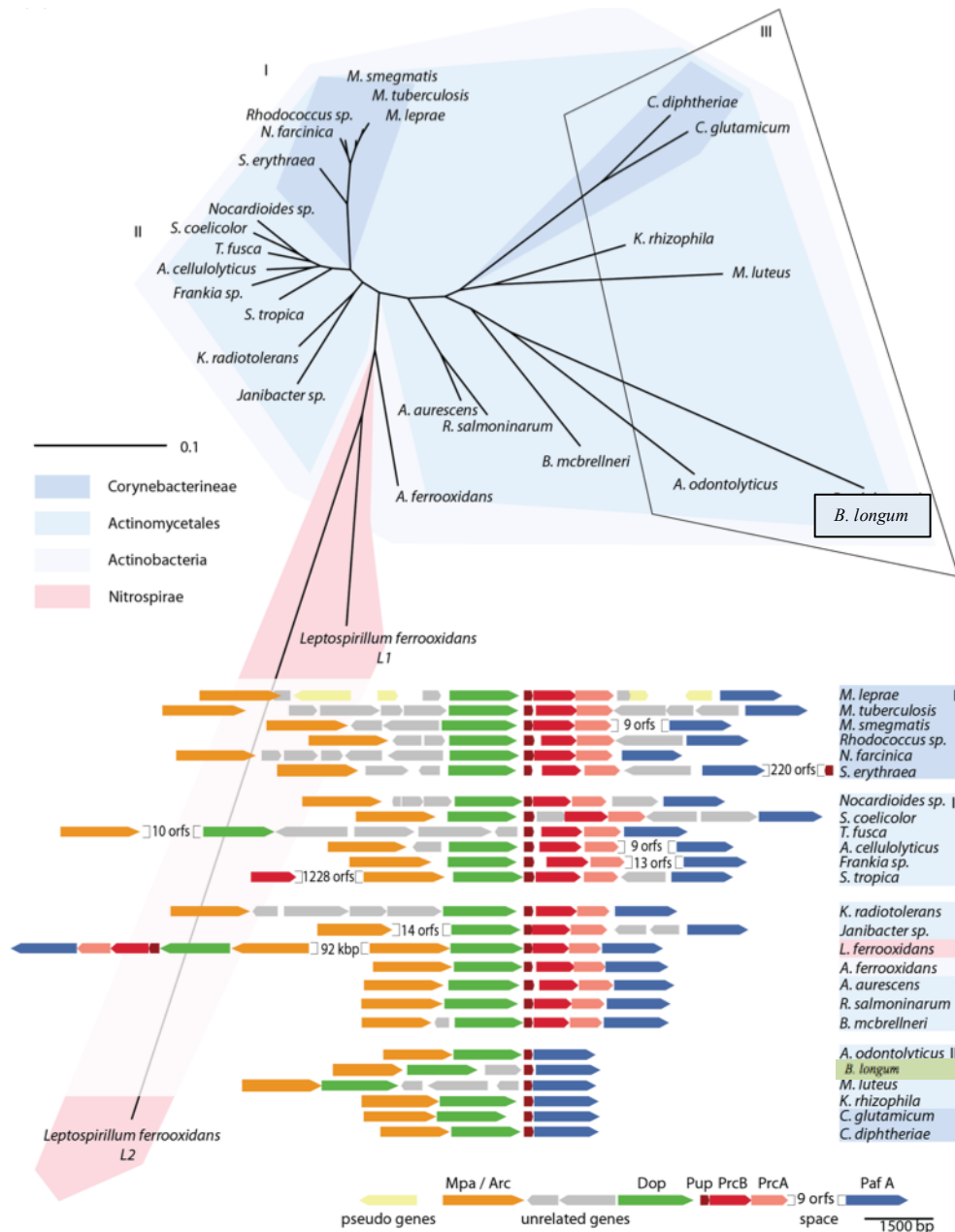


Figura 4. Organización genómica de los genes que participan en el mecanismo de pupilación. Análisis filogenéticos realizados con las secuencias de aminoácidos de las proteínas Arc, Pup, Dop y PafA muestran una marcada tendencia a agrupar los organismos que poseen los genes PrcA y PcrB (agrupaciones I y II), mientras que los miembros en los que están ausentes se observa una mayor variación en sus secuencias (agrupación III). El género *Leptospirillum ferrooxidans*, miembro de Nitrospirae, probablemente se originó como miembro de los acidimicrobiales, una subclase de las actinobacterias. Modificado de (Barandun *et al.* 2012).



Figura 5. Organización genómica de *arc*, *dop*, *pup* y *pafA* en *B. longum* subsp. *infantis*.

1.5 Reconocimiento y desdoblamiento de sustratos por las ATPasas durante la degradación de proteínas mediada por proteosomas.

En la Figura 6 se describe el modelo de proteólisis basado en el complejo formado por las proteínas ATPasas (ARC/Mpa, PAN) y las subunidades del proteosoma. En este esquema se observa que el dominio N-terminal en la región “coiled-coil” de cada subunidad de las chaperonas forma estructuras en pares (bucles salientes) con la subunidad vecina. Las tres estructuras en pares sobresalen del centro de la ATPasa, rodean el poro y sirven como punto de entrada para el reconocimiento de las proteínas blanco a degradar (Djuranovic *et al.* 2009).

La presencia de un bucle aromático-hidrofóbico (Ar- ϕ) dentro de la región más estrecha del canal de la ATPasa puede tomar y desplazar las proteínas, este proceso es conducido por hidrólisis de ATP. El desdoblamiento de la proteína ocurre a partir de la repetición de este evento energético; donde la unión del nucleótido provee una plataforma rígida y una apertura estrecha para estimular este proceso (Sauer y Baker 2011).

Las proteínas desdobladas son translocadas a través del poro central de la ATPasa hacia el interior del proteosoma para su degradación (Wang *et al.* 2010).

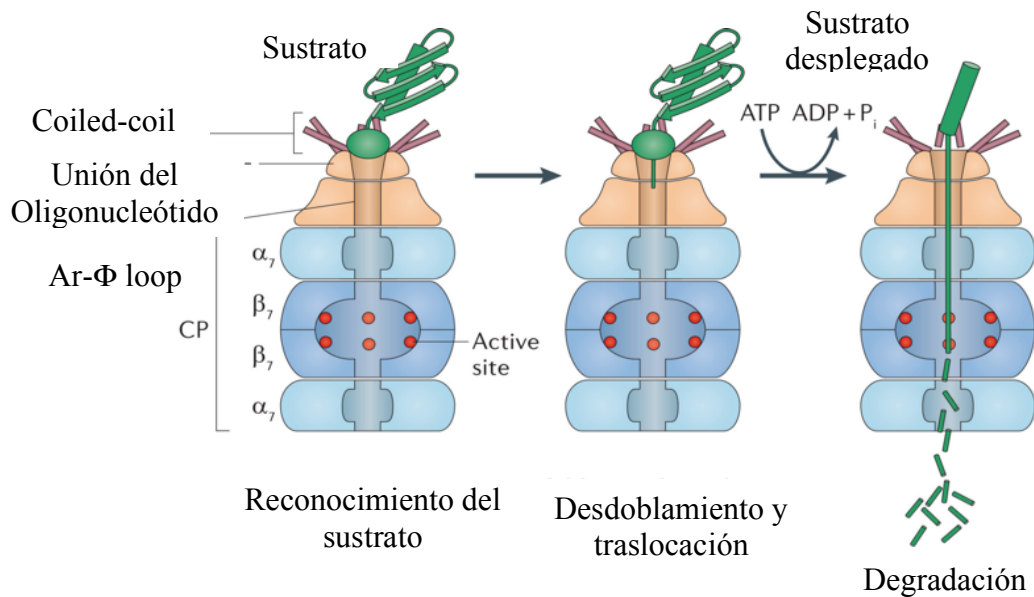


Figura 6. Reconocimiento, desdoblamiento y degradación de sustratos en actinobacterias (Maupin-Furlow 2012).

Además, se ha propuesto que la cooperación entre dos subunidades de estas proteínas permiten la unión e hidrólisis de ATP (Figura 7, subunidades rojas), lo que conlleva al desdoblamiento de sustratos debido a los cambios conformacionales generados durante la reacción, y la posterior liberación de ADP en las subunidades contiguas (Figura 7, subunidades azules) (Smith *et al.* 2011; Bar-Nun and Glickman 2012).

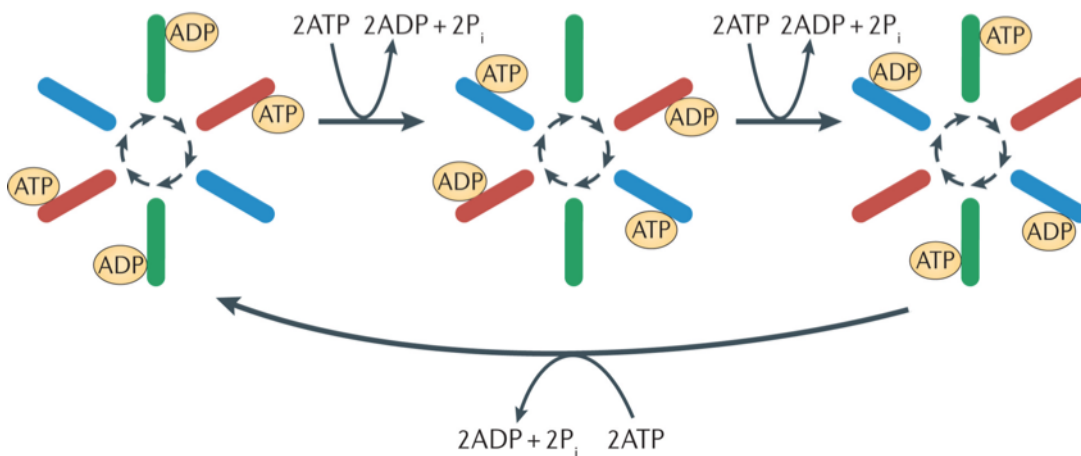


Figura 7. Mecanismo de las ATPasas en el desdoblamiento de sustratos (Tomado de Maupin-Furlow 2012).

1.6 Objetivos

Objetivo general

Expresar en *Escherichia coli* y caracterizar proteínas ARC y Pup provenientes de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.

Objetivos específicos

- Expresar la proteína ARC de *B. longum* subsp. *infantis* en *E. coli* y evaluar su actividad enzimática (ATPasa).
- Expresar la proteína Pup de *B. longum* subsp. *infantis* en *E. coli* y evaluar su estructura.
- Analizar *in silico* las proteínas accesorias Dop y PafA presentes en *B. longum* subsp. *infantis*.
- Determinar los posibles sitios de pupilación en el proteoma de *B. longum* subsp. *infantis* por análisis *in silico*.

2. Materiales y Métodos

2.1 Bioinformática

Para el alineamiento de las secuencias en aminoácidos se utilizó el programa Bioedit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). El modelado de la estructura tridimensional de la proteína se realizó en la plataforma I-TASSER (Zhang 2008; Roy *et al.* 2010; Roy *et al.* 2012). El programa USFC-Chimera se usó para el manejo y visualización de las estructuras (Meng *et al.* 2006).

2.2 Análisis del proteoma de *B. longum* subsp. *infantis* con iPup software.

La búsqueda de los sitios de pupilación en el proteoma completo de *B. longum* subsp. *infantis* se hizo en el software iPup (<http://cwtung.kmu.edu.tw/ipup>) (Tung 2013).

2.3 Amplificación del gen Blon_ 2125 (*pup*)

El ADN genómico de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* fue extraído según el protocolo reportado por Guzmán 2011.

El gen *blon_2125* se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se generaron secuencias de nucleótidos para la amplificación del gen, se adicionaron dos sitios de restricción *Nco I* y *Xho I* en los extremos 5' y 3' respectivamente: sentido 5'-CTAGCTAGCATGCCACAACAATTGGAAC-3'; antisentido 5'- CCGCTCGAGCTCGCCGCCTTTTT-3'.

Para la reacción se utilizó 100 ng de ADN genómico de *B. longum*, 0.2 μ M de cada oligonucleótido, 0.02 mM de dNTP's (A,T,C,G. Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 1 U de polimerasa de alta fidelidad *Pfx* (Promega) y buffer PCR 1X en un volumen final de 50 μ L. El programa de amplificación se programó en un termociclador (BioRad) con un calentamiento inicial a 94°C durante 4 min, seguido por 25 ciclos de 94°C por 1 min., 57°C por 1 min. y 68°C por un min., con una extensión final a 68°C

durante 10 min.

Los productos amplificados se procesaron con el *kit* de limpieza para productos de PCR (Anexo II). Las amplificaciones recuperadas se analizaron en geles de agarosa al 1% (Anexo 6).

2.4 Clonación en el Sistema TOPO 4.

La reacción total para la clonación en el sistema TOPO 4 fue de 6 μ l. La mezcla final contenía: 2 μ l del producto de PCR, 1 μ l de solución salina, 2 μ l de agua estéril y 1 μ l del vector. La reacción se incubó 15 min a temperatura ambiente, seguida de otra incubación de 20 min en hielo; se dió el choque térmico a 42 °C 2 min y se dejaron las células reposar en medio LB durante 1 h a 37 °C. Las células se plaquearon en cajas con medio LB sólido con Kanamicina (50mg/ml).

2.5 Subclonación en el vector de expresión pET28a+.

El gen *pup* clonado en el vector TOPO 4 se subclonó en el plásmido de expresión pET28a+ (Invitrogen), que es regulado por el promotor T7.

La subclonación se realizó por digestión del vector TOPO 4 y el vector pET28a+ con las enzimas *Nco*I y *Xho*I y una ligación posterior con una relación molar 1:3 (vector: inserto) en 10 μ l con 1 U de ligasa T4 (Promega) y buffer de ligación rápida (Promega).

2.6 Transformación

Para los ensayos de expresión de la proteína ARC se utilizó la construcción pET28a+*bl-arc*, generada en el trabajo de tesis de maestría (Guzmán 2011) y para la proteína Pup la construcción pET28a+*pup*.

Para iniciar la transformación se prepararon células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS por el método de cloruro de magnesio (Anexo III). A cada vial de 60 μ L de células competentes se les agregó 10 μ l del plásmido (pET28a+inserto *bl-arc*) y se incubaron 30 min en hielo, se prosiguió a dar el choque térmico a 42°C por 45 s para luego incubar el vial en hielo por 1 min (Anexo IV). Después de este

tiempo se les adicionó 400 ml de medio líquido LB y se incubaron a 37°C durante 1 h. Después de la incubación las células se plaquearon en cajas con LB agar con antibiótico (50 mg/ml kanamicina / 35 mg/ml cloranfenicol) y se incubaron a 37 °C 12 h.

2.7 Minipreparaciones

De las colonias obtenidas en las cajas plaqueadas se seleccionaron algunas colonias aisladas y se inocularon en 10 ml de medio LB líquido con antibiótico (50 mg/ml kanamicina / 35 mg/ml cloranfenicol).

Las células se centrifugaron y la pastilla celular se recuperó (10,000 rpm). El ADN plasmídico se extrajo según las instrucciones del kit QIAgen (Anexo V).

Se verificó que los plásmidos recuperados tuvieran los insertos, para ello se hicieron digestiones con las enzimas de restricción *Nde I* y *Xho I* (*arc*) y *NheI* y *XhoI* (*pup*) con una incubación de 2 h a 37°C. Las clonas positivas fueron secuenciadas (Laboratorio de LANBAMA en IPICYT).

2.8 Expresión heteróloga

La expresión se inició en un volumen de 50 ml de medio LB líquido con antibióticos, inoculándolo con células con las construcciones (pET 28a+*bl-arc* / pET28a+*pup*), una vez alcanzada la densidad óptica de 0.6 a 600 nm, se realizó la inducción con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 0.5 mM y posteriormente se incubaron 6 h a 28 °C.

Las células se centrifugaron y la pastilla celular se congeló a -70°C. La expresión de la proteína BI-ARC se analizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10%.

2.9 Purificación por columnas de afinidad de Ni²⁺

La purificación de las proteínas se realizaron en columnas de afinidad con resina de Ni²⁺ (QIA Ni-NTA). La proteína unida a la resina se recuperó en buffer con imidazol (500mM) (Anexo X).

Las proteínas recuperadas se dializaron con buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.5 para Bl-ARC y para Pup el buffer 50 mM NaH₂PO₄ pH 6.0.

Las fracciones colectadas se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% (Anexo VIII).

2.10 Western blot

Las proteínas separadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham), en una cámara horizontal Semy-Dry Trans-blot (BioRad). Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal anti-His Tag producido en conejo (rabbit anti-His Tag, Serotec) a una dilución de 1:10000 y un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa-alcalina (anti-rabbit IgG, Sigma) a una dilución de 1:10000. La detección de la proteína se realizó colorimétricamente al incubar con *p*-nitro azul tetrazolium y sodio-5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato (NBT y BCIP, Amersham Biosciences) (Anexo IX). El análisis de las membranas y de los geles se llevó a cabo en un fotodocumentador Gel-Doc 2000 (BioRad) y el software Quantity One™ versión 4.5 (BioRad).

2.11 Espectrometría de masas

La secuencia de la proteína se identificó por espectrometría de masas (LC-ESI-MS/MS) en el laboratorio LINAN del IPICyT. El análisis de los datos se procesó en el software MASCOT (Matrix Science, London, UK).

2.12 Actividad ATPásica

La actividad ATPásica se midió por hidrólisis enzimática de ATP con el ensayo verde malaquita (Lanzetta *et al.*, 1979). Se preparó una mezcla de reacción con 10 µg de proteína, 1mM ATP, y 10mM MgCl₂ en un volumen total de 50 µl. La mezcla se incubó por 15 min a 37°C y se detuvo con la adición de 800 µl de reactivo de color (Verde de malaquita 0.045% y 4.2% de molibdato de amonio, mezcla 3:1 en 4N de HCl, 0.1% de Tritón X-100 y 100 µl de una solución de citrato de sodio al 34%) (Anexo XII). La medición de la actividad ATPásica se determinó a 640 nm en el espectrofotómetro Cary Bio 50 (Varian) contra una curva estándar de fosfato inorgánico.

2.13 Dicroismo circular

Las mediciones de dicroismo circular (DC) se realizaron en el espectrofotómetro Jasco J6815. El espectro se capturó en un rango de longitudes de onda entre 200 a 300 nm en una celda de cuarzo de 1 mm de espesor a una concentración de 0.2 mg/ml de proteína a temperatura ambiente. El espectro final fue obtenido del promedio de 5 repeticiones.

2.14 Coinmunoprecipitaciones

Para determinar proteínas interactoras con Pup y BI-ARC, se diseñó un ensayo de co-inmunoprecipitación. El anticuerpo que se utilizó para fijar las proteínas recombinantes fue el anti-His (mouse anti-His Thermoscientific), que se unió a las microesferas de agarosa (proteína G, Immunoprecipitation Starter Pack GE Healthcare). Se usaron 30 µl de esferas con proteína G, que fueron lavadas en buffer de lisis (PBS: 1 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) para eliminar residuos de etanol. Luego se incubaron 1 h en agitación con 1 µg de anticuerpo a 4°C; enseguida se lavaron con buffer de lavado (50 mM Tris, pH 8.0), para incubarlo 1 h con las proteínas ARC y Pup en ensayos independientes, tras la incubación las esferas se lavaron con buffer de lavado y se incubaron 2 h con extractos de *B. longum*, al termino de la incubación se lavaron

las esferas; finalmente se recuperaron las proteínas en el buffer de carga (1% SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris, 0.1% azul de bromofenol pH 7.5). Se calentaron 3 min a 95°C y se centrifugaron para obtener el sobrenadante, que fue analizado en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

3. Resultados y discusión

3.1 Estudio de la proteína BI-ARC en *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.

3.1.1 Análisis bioinformático de la proteína BI-ARC

La secuencia de aminoácidos del gen IPR003593 se agrupó en el clado que corresponde a otras proteínas ARC (AAA ATPase forming Ring-shaped Complexes (Frickey y Lupas 2004). Con esta información se asignó a la proteína una nueva nomenclatura: BI-ARC (*Bifidobacterium longum* ARC).

La secuencia de aminoácidos de BI-ARC presenta un 40% de identidad con las proteínas ARC de *Rhodococcus erythropolis* (Genbank AAC6869.1) y *Streptomyces coelicolor* (Genbank AAC64282.1).

El alineamiento en secuencias de aminoácidos mostró que BI-ARC mantiene similitud con secuencias de proteínas involucradas en vías de degradación mediadas por proteosoma, entre estas proteínas se encuentra PAN (Smith *et al.* 2005) y la subunidad proteosomal Rpt1 (Bar-Nun and Glickman 2012).

La proteína BI-ARC posee los 3 motivos conservados y característicos de las ATPasas AAA que son clave para su función catalítica. El motivo Walker A se localiza entre los residuos Gly232 y Leu240, el motivo Walker B cubre los residuos Iso311 a Glu316, y finalmente la segunda región de homología localizada entre los sitios Ala358 a Asp 376 (Figura 8).

La presencia de estos motivos sugiere que la proteína puede tener funciones catalíticas y puede participar en los eventos celulares como motor generador de energía. En los motivos Walker A y B se localizan los sitios responsables de la unión a los nucleótidos y en la segunda región de homología ocurre la hidrólisis del ATP (Beyer 1997).

En la secuencia de aminoácidos se identificó la presencia del sensor 1, el cual permite el contacto con el fosfato γ del nucleótido y sensa la presencia de ATP ó ADP. Además el dedo de arginina (R371) conservado que también tiene interacción con el nucleótido (Figura 8).

BI-ARC contiene en el dominio N-terminal (estructura “coiled-coil” entre los residuos Met1 a Pro46) algunos residuos conservados como tres leucinas en posiciones 7, 14, 21 y un residuo de alanina Ala28; además de otros aminoácidos como Ala 35, Lys 36, Leu39, Leu42, pro45 y Pro46. Dichos residuos conservados en la región N-terminal han sido descritos como parte fundamental para el reconocimiento de sustratos que han sido etiquetados para degradación (Djuranovic *et al.* 2009) (Figura 8).

El dominio C-terminal es una región menos conservada en esta familia de proteínas. En este segmento de la proteína BI-ARC encontramos la delección de ~15 aminoácidos (Caja I) y otra región de ~ 23 aminoácidos (Caja II) (Figura 9). Estos segmentos se encuentran ausentes en proteínas ARC que provienen de bacterias que al igual que *B. longum* no poseen la partícula 20S proteosomal. Por lo que, estas regiones pudieran estar involucradas en la interacción con las subunidades α proteosomales en *Mycobacterium* y *Rhodococcus*.

Figura 9. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas ARC. La segunda región de homología (SRH) está indicada en negro. Las regiones de ARC específicas para actinobacterias que poseen proteosoma (cajas I y II). Abreviaciones utilizadas en los nombres de los organismos: Blon, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*; Cef, *Corynebacterium efficiens*; Cdi, *C. diphtheriae*; Cglu, *C. glutamicum*; Mlep, *M. leprae*; Mtub, *M. tuberculosis*; Rery, *R. erythropolis*; Scoe, *S. coelicolor*.

En el árbol filogenético mostrado en la Figura 4 se puede visualizar la agrupación de los géneros de bacterias que no poseen las subunidades del proteosoma 20S en un clado distinto (*Corynebacterium* y *Bifidobacterium*) de aquellos géneros que sí las conservan (*Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*) (Zhang *et al.* 2004).

Algunos autores argumentan que las actinobacterias poseen el proteosoma 20S original y por tanto, a partir de ellas se evolucionaron los proteosomas de arqueas y eucariontes. Mientras que algunas bacterias entre ellas las bifidobacterias y corinebacterias perdieron esta información a través del tiempo (Valas and Bourne 2008).

3.1.2 Expresión y purificación de la proteína BI-ARC

Para expresar la proteína BI-ARC se usó la construcción el gen *bl-arc* en el vector de expresión pET28a generado anteriormente (Guzmán 2011), con este plásmido se expresó la proteína BI-ARC (Figura 10a) y se purificó (Figura 10b). Además se determinó su identidad por Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-his (Figura 10c).

Se realizaron geles nativos de poliacrilamida, los que mostraron la probable formación de una estructura hexamérica (Figura 10d).

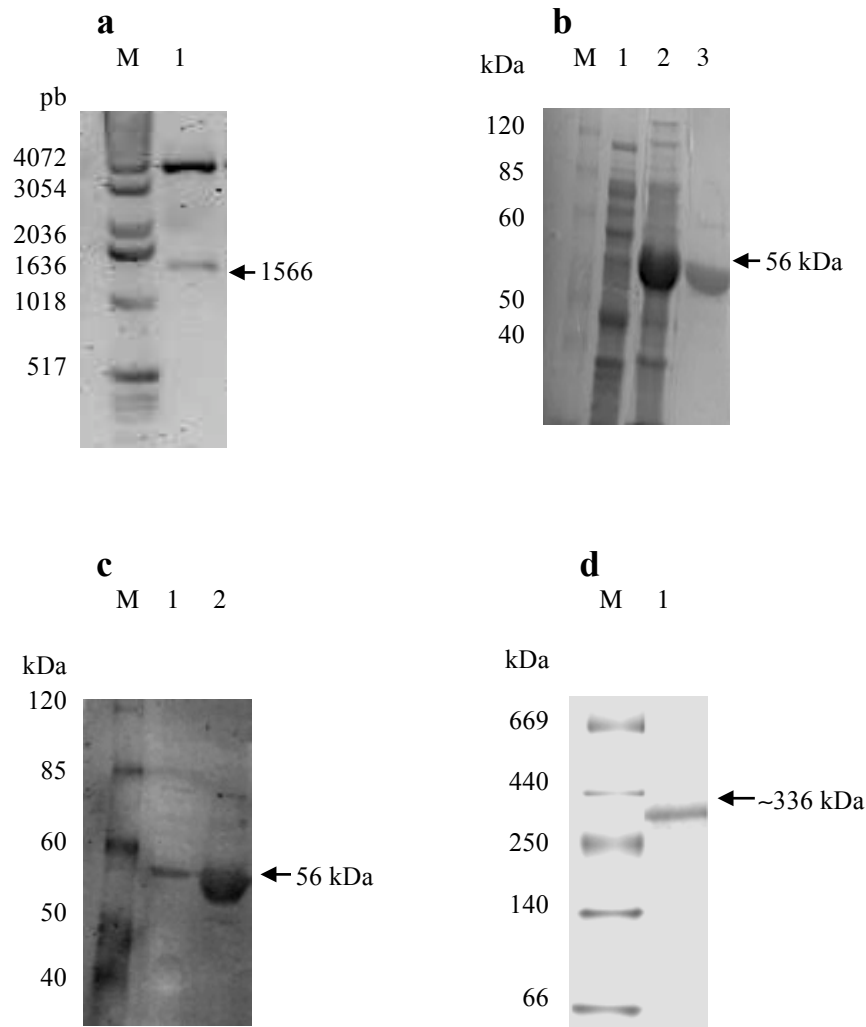


Figura 10. Clonación, expresión y purificación de BI-ARC. a) Clonación del gen *bl-arc* en pET28a. M) Marcador de peso molecular en pb, 1) Digestión del plásmido con la liberación del inserto (*bl-arc*). b) Expresión y purificación de la proteína BI-ARC. M) Marcador de peso molecular en kDa, 1) Control negativo, incubada sin IPTG, 2) Inducción con IPTG 0.5 mM, 3) Proteína purificada. c) Western blot de la proteína BI-ARC. M) Marcador de peso molecular en kDa, 1) y 2) BI-ARC purificada. d) Gel nativo de poliacrilamida. M) Marcador de peso molecular en kDa, 1) Proteína BI-ARC purificada en condiciones nativas.

3.1.3 Caracterización de su actividad ATPasa

Por un lado se evaluó la actividad de la proteína BI-ARC recombinante frente a distintos metales (Tabla 2). Se observó que BI-ARC tiene su mayor actividad en presencia de magnesio como cofactor, con ZnCl_2 mostró actividad de 60%, el efecto es casi nulo en presencia de CoSO_4 y CaCl_2 .

Tabla 2. Actividad de BI-ARC con distintos compuestos en presencia de 1 mM ATP	
Metal [10 mM]	% Actividad relativa
MgCl_2 (control)	100
MnCl_2	34
CuCl_2	12
ZnCl_2	62
CoSO_4	9
CaCl_2	3

n=3 repeticiones, $p < 0.01$.

Por otro lado se evaluó la capacidad de BI-ARC para hidrolizar nucleótidos distintos al ATP, ya que algunas proteínas AAA caracterizadas presentan actividades en presencia de nucleótidos distintos a ATP; BI-ARC mostró preferencia por el ATP frente al resto de los nucleótidos (Figura 11).

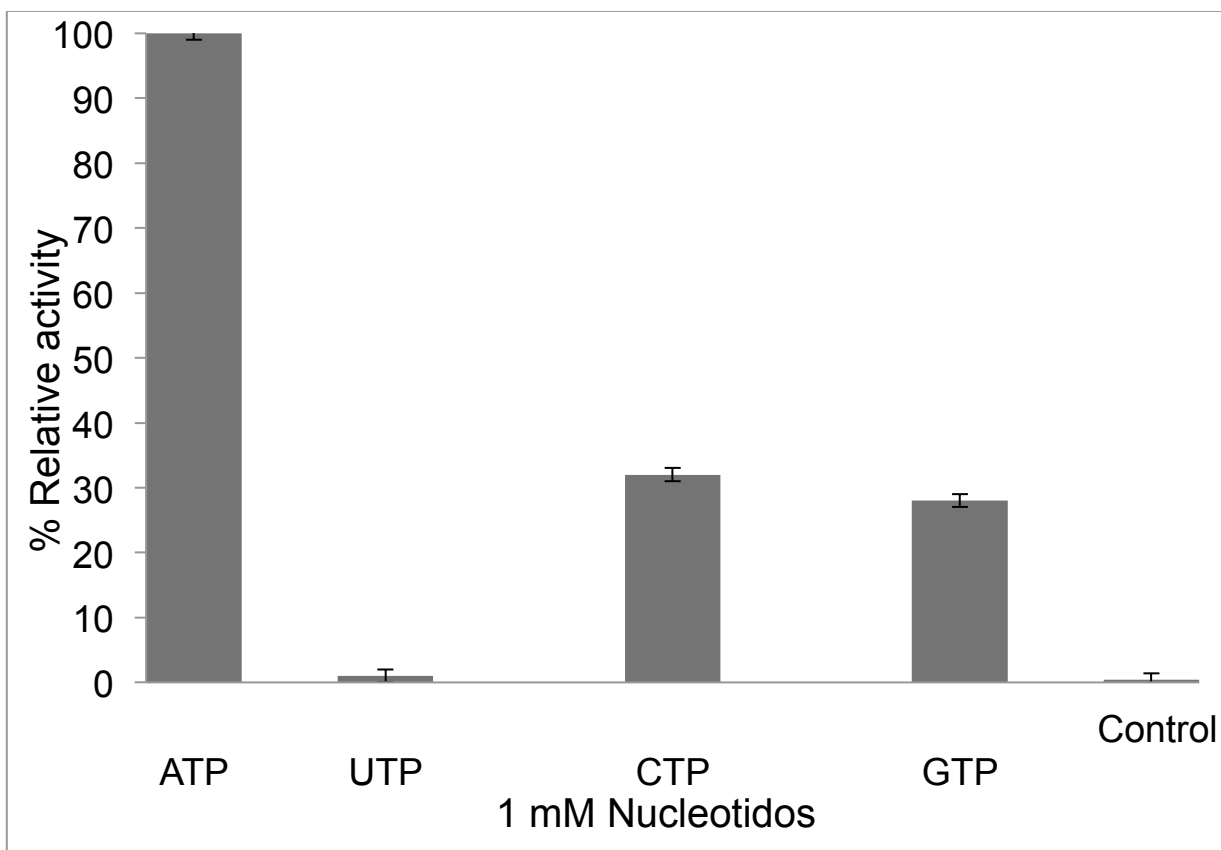


Figura 11. Actividad de la proteína BI-ARC en presencia de diferentes nucleótidos.
n=3 repeticiones, $p < 0.01$.

Tanto el cofactor Mg^{2+} , así como el ATP son compuestos muy utilizados en actividades catalíticas en muchas de las proteínas AAA y en la mayoría de los casos mantienen gran afinidad por estos sustratos (Briskin y Poole 1983). También se ha reportado que la presencia de cofactores durante la actividad enzimática es fundamental, ya que ayudan a modular la conformación de la proteína (Wang *et al.* 2009; Schlieker *et al.* 2004; Martin *et al.* 2005).

Como parte de la caracterización se determinó el efecto de algunos inhibidores sobre la actividad de BI-ARC, en presencia de EDTA, α - β Metiladenosina 5' trifosfato y NEM (N-etilmaleimida) (Tabla 3) la actividad es inhibida.

El EDTA actuó como agente quelante de los iones magnesio, lo que impidió su unión al motivo Walker A, por lo tanto se perdió la actividad catalítica. El análogo del ATP (α - β Metiladenosina 5' trifosfato) no pudo ser hidrolizado por la proteína, por lo que no se observó actividad. La inhibición de la actividad en presencia de NEM es provocada por la interacción de este compuesto con los residuos sulfhidrilo presentes en las proteínas y parece ser una característica que se ha observado en esta familia de ATPasas AAA.

Además, se monitoreó la cinética de la proteína a 37°C y un pH de 5.0; se determinaron los parámetros cinéticos: K_m 327 μ M, V_{max} 492 (pmol/min/ μ g) (Figura 12).

Tabla 3. Actividad de BI-ARC en presencia de inhibidores		
Inhibidor	mM	% Actividad relativa
MgCl ₂ (control)	10	100
EDTA	10	0
NEM	10	3
ADP	1	3
α - β Metiladenosina 5' trifosfato	1	0

n= 3 repeticiones, p<0.01

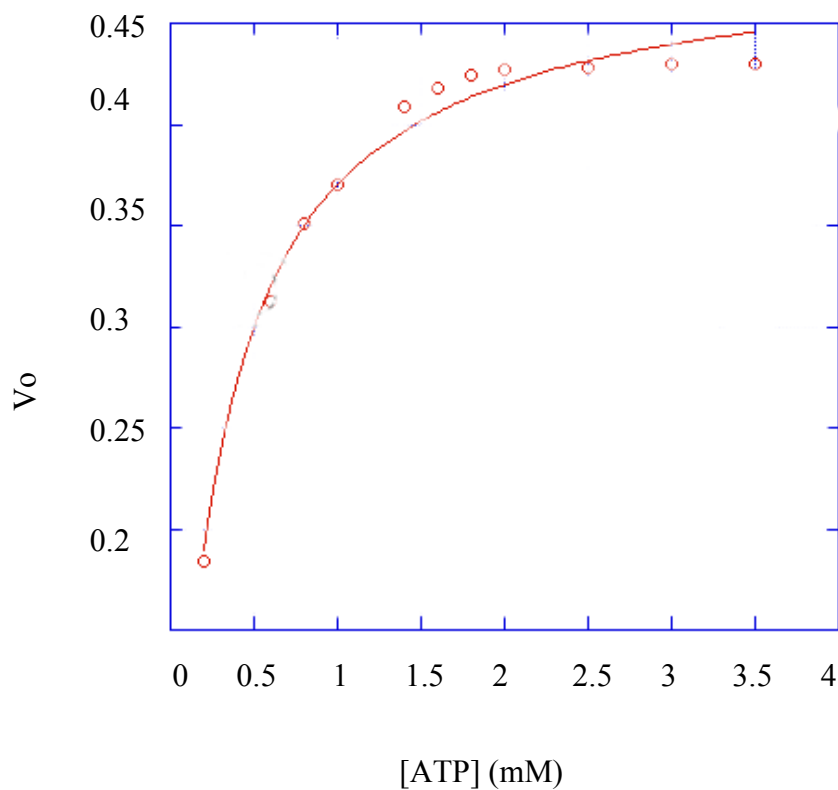


Figura 12. Cinética de Michaelis-Menten para BI-ARC. V_0 (mMs^{-1}) contra la concentración de ATP. $R^2 = 0.963$

3.1.4 Espectrometría de masas

La proteína pura se analizó por espectrometría de masas, los datos m/z fueron analizados empleando el programa MASCOT. El análisis confirmó la identidad de la proteína, mostrando que BI-ARC es una ATPasa AAA de *B. longum* subsp. *infantis* con un 63% de cobertura en la secuencia (Figura 13).

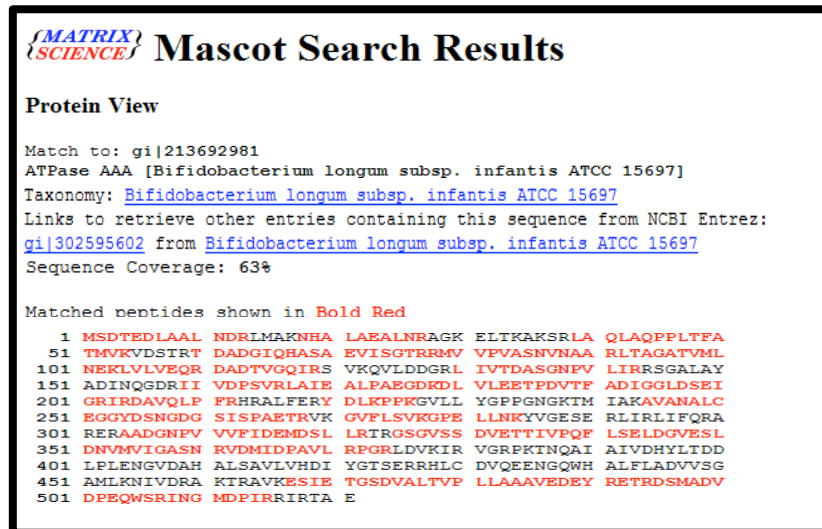


Figura 13. Secuencia de la proteína sobreexpresada, analizada por espectrometría de masas.

Para conocer el patrón de ionización de esta proteína, se analizaron algunas fracciones por espectrometría de masas con la técnica de dispersión por electrospray.

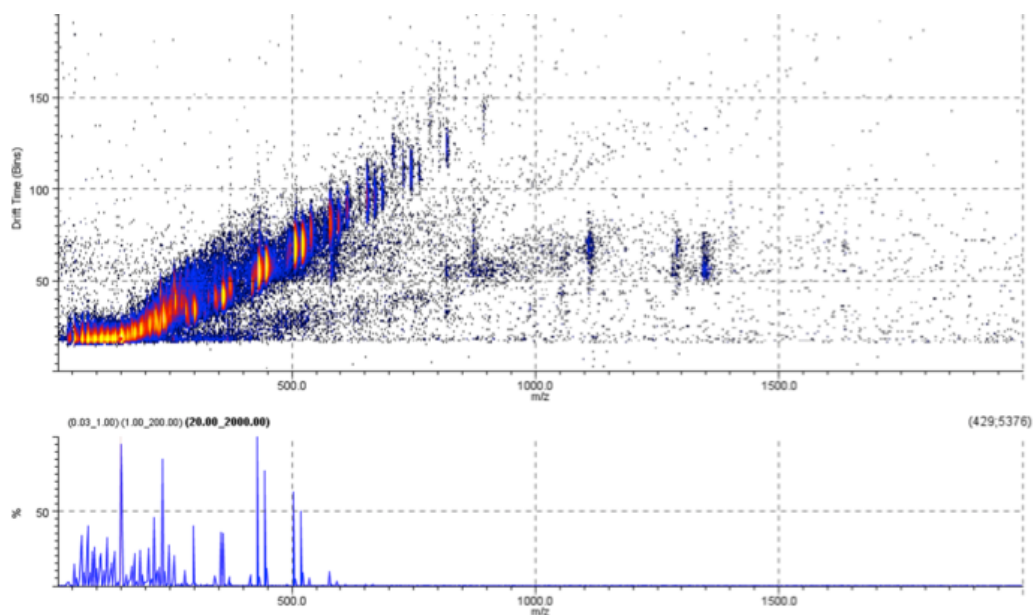


Figura 14. Espectro de ionización de la proteína BI-ARC, analizada por electrospray.

Se logró obtener un patrón de ionización para la proteína BI-ARC, en la Figura 14 se visualiza el estado de ionización de los aminoácidos que conforman la proteína. Este protocolo se estandarizó para hacer posteriormente el análisis estructural que nos aporte información sobre la estructura de esta proteína.

Los iones que se generaron pueden estar protonados de forma múltiple, lo que da lugar a diferentes especies para una misma molécula. En este caso los péptidos generados que contengan residuos de histidina, arginina y lisina serían los candidatos a protonarse.

3.1.5 Modelado en 3D

Para conocer la posible estructura tridimensional de BI-ARC se generó un modelo en 3D por homología contra proteínas AAA ya cristalizadas.

La plataforma I-TASSER generó un modelo basado en la estructura de la subunidad p97 (PDB: 3CF1) que es el modelo más utilizado para el estudio general de las proteínas AAA, que tienden a formar hexámeros (Zhang *et al.* 2000). El modelo obtenido mostró un valor de TM de 0.50, un C-score de -1.79 y un RMSD estimado de 11.7 Å.

Este valor de 0.5 indica gran similitud entre ambas estructuras, es decir que el modelo generado no se produjo al azar (TM-score > 0.5 indica un modelo de topología con mayor similitud estructural global entre el modelo y la estructura molde, mientras que un valor de TM < 0.17 indica una estructura al azar).

Por otro lado, el C-score estima la calidad de los modelos predichos (El rango oscila entre -5 y 2, valores positivos indican mayor exactitud) y finalmente los valores de RMSD indican la distancia promedio entre átomos de dos estructuras sobrepuestas, valores positivos indican mayor exactitud entre los modelos.

En la Figura 15 se muestra el modelo generado para una subunidad de la proteína BI-ARC, en este modelo se resalta la presencia de los tres motivos conservados encontrados en el alineamiento de secuencias (Walker A, Walker B y Segunda Región de Homología).

Estas regiones canónicas además de estar conservadas en secuencia de aminoácidos, conforman una estructura clásica de proteínas AAA (P-loop NTPases). El plegamiento canónico de estas P-loop NTPases es sencillo de identificar, ya que su estructura secundaria está representada por la formación de cinco láminas β flanqueadas por algunas hélices α (Ogura and Wilkinson 2001).

De manera más puntual, encontramos que el motivo Walker A (GxxxxGKT, x=cualquier residuo) forma un plegamiento (P-loop) que conecta la lámina $\beta 1$ con la hélice α contigua, mientras que el motivo Walker B (hhhhDExx, h = residuo hidrofóbico) se ubica en la lámina $\beta 3$. Por su naturaleza anfipática las láminas $\beta 2$ y $\beta 5$ son las estructuras que están expuestas hacia la parte externa de la proteína. La segunda región de homología se ubica en la lámina $\beta 4$ y la subsiguiente hélice α (Figura 15).

En lo que se refiere a la región C-terminal entre las proteínas AAA se ha descrito como una región variable en tamaño y es menos conservada que la región N-terminal, se observan básicamente α -hélices en su estructura. Residuos de esta región contribuyen significativamente en la unión del nucleótido con aminoácidos cargados positivamente de la región N-terminal, posicionándola para que ocurran interacciones con los grupos fosfatos. Además en esta región es donde el nucleótido ATP se ensambla, con la base de adenina rodeada por residuos del segmento N-terminal y C-terminal. Por lo que, la unión/hidrólisis del nucleótido debe estar acompañada de movimientos de los dominios AAA de las regiones N-terminal y C-terminal de la proteína, que conducen a su funcionamiento como motor molecular en la célula.

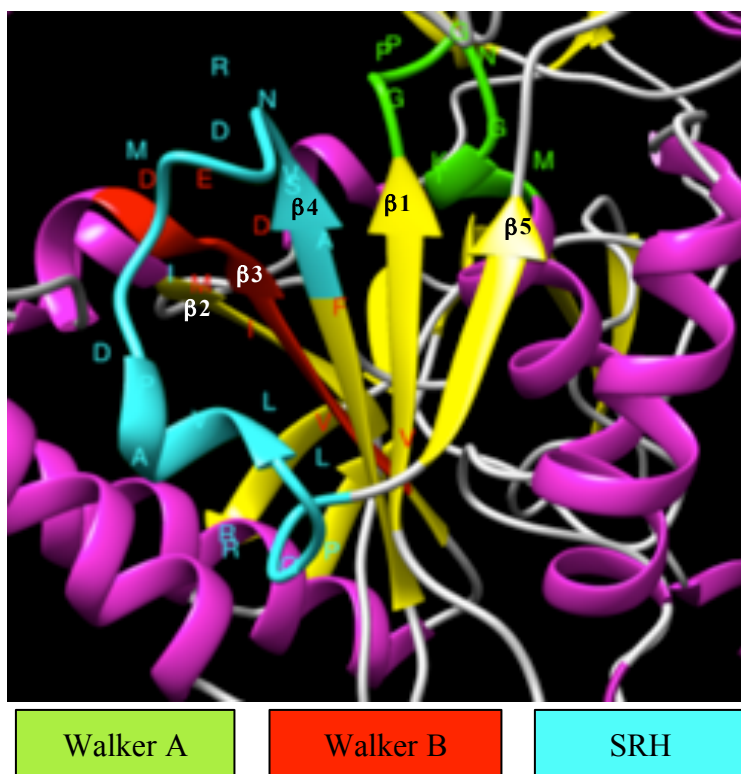


Figura 15. Modelo en listones de la estructura tridimensional de la proteína BI-ARC. Acercamiento a las estructuras que forman parte del dominio AAA de la proteína, en donde se denotan los motivos Walker A, Walker B y la segunda región de homología (SRH), que participan en la unión al ATP. Las hélices y bucles que rodean a esta región ($\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 1$ y $\beta 5$) fueron eliminadas para mejor claridad.

El estado biológicamente activo de estas chaperonas está condicionado a la formación de anillos con un poro central (Wolf *et al.* 1998), a través del cual los sustratos se desdobl原因 y translocan al interior de los sitios catalíticos de las proteasas/partículas 20S proteosomales, donde serán fragmentados.

En análisis bioinformáticos y estructurales se muestra que estas proteínas (Mpa/ARC, PAN y Rpt) poseen características típicas de ATPasas, dentro de las que resaltan la formación de complejos oligoméricos (Wolf *et al.* 1998; Darwin *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2004). Los poros centrales formados en estas proteínas permiten activar la proteólisis, promoviendo la apertura del poro central del

proteosoma, con lo que se hace posible el acceso hacia la parte proteolítica del sistema.

Debido a esta característica estructural, además del análisis de una subunidad de la proteína BI-ARC, se logró generar el modelo de estructura hexamérica completa, basado en el cristal del interdominio y la región N-terminal de la proteína ARC (Mpa) de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB 3FP9) (Figura 16a). Inicialmente se identificó en la secuencia de la proteína BI-ARC la región de aminoácidos que comprende el dominio N-terminal y el interdominio, se generó un modelo por homología considerando únicamente esta región, se observó que la estructura era superponible al cristal de la proteína Mpa. A partir de este resultado se realizó el modelado completo de la proteína BI-ARC representando en distintos colores las seis subunidades de la proteína (Figura 16b).

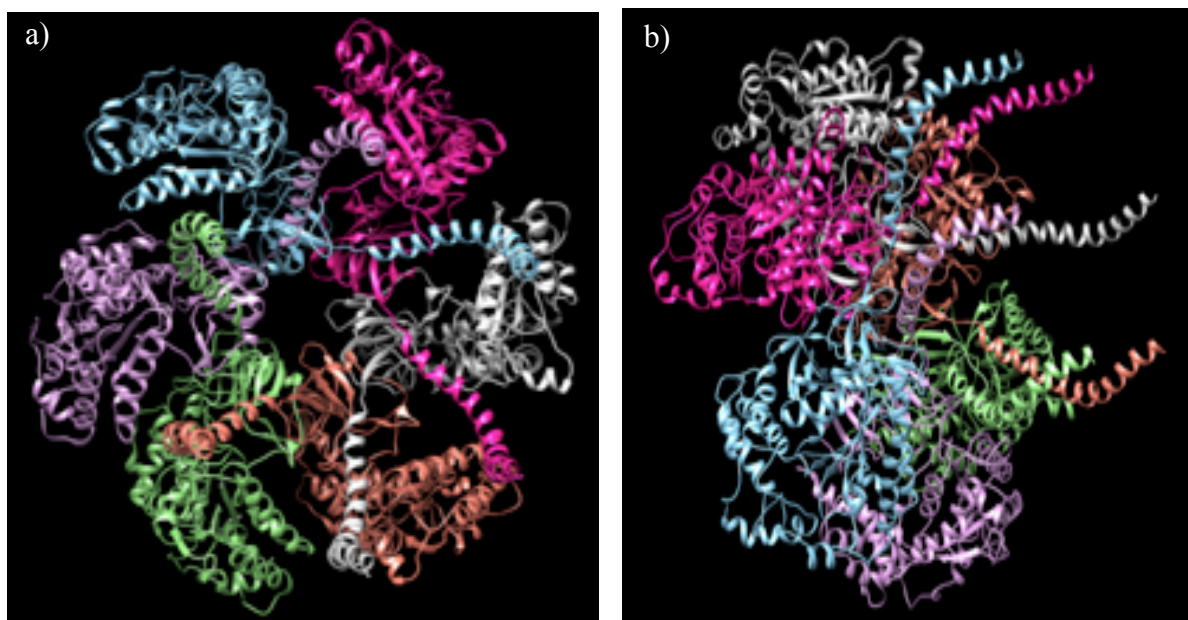


Figura 16. Modelado *in silico* del hexámero de la proteína BI-ARC

- a) Vista transversal del modelo tridimensional de la estructura hexamérica de BI-ARC.
- b) Vista longitudinal del modelo hexamérico de BI-ARC.

En estas proteínas el desdoblamiento de los sustratos se efectúa por cambios conformacionales en los motivos conservados (Walker A, B y SRH), causados por la hidrólisis de ATP, dando como resultado una fuerza rotacional que permite separar los dominios de otras proteínas.

Otra de los segmentos importantes en estas proteínas es la región N-terminal donde se ha reportado que ocurre el reconocimiento de los sustratos blancos a degradar (sustratos pupilados) (Yu *et al.* 2010).

En una vista longitudinal de la estructura hexamérica de BI-ARC se observa como la parte N-terminal queda expuesta (Figura 16b), lo que permite un fácil acceso y reconocimiento de las proteínas Pup (Sutter *et al.* 2009).

Esta característica estructural fue observada en el cristal de la proteína Mpa de *M. tuberculosis*, ya que presenta hélices α que sobresalen del poro central de la proteína y están organizadas en pares (Wang *et al.* 2010). Aunque aun no se ha establecido si estas terminaciones son altamente flexibles o inflexibles durante el reclutamiento y desdoblamiento de proteínas, podrían facilitar el reconocimiento de sustratos marcados con proteínas Pup como señal de degradación.

3.2 Análisis de la proteína Pup en *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.

3.2.1 Análisis de la secuencia primaria de aminoácidos de Pup

En el análisis bioinformático se encontró que la proteína Pup de *B. longum* conserva un motivo GGE al final de la secuencia (Figura 17), donde el ácido glutámico de este motivo forma el enlace peptídico con la lisina de la proteína que será etiquetada. La secuencia en aminoácidos mantiene una región consenso en el dominio C-terminal (línea verde, Figura 17), en este segmento ocurre la interacción con la proteína ARC (Striebel *et al.* 2009; Sutter *et al.* 2009).

La región N-terminal en las proteínas Pup se muestra como una porción carente de estructura definida (línea naranja, Figura 17), esta condición le confiere flexibilidad para ser reconocida por la chaperona ARC.

Cabe mencionar que en la región N-terminal de la proteína ARC de *M. tuberculosis* se lleva a cabo el reconocimiento de proteínas pupiladas, ya que versiones a las que se les deletó esta región, no son reconocidas para su degradación (Sutter *et al.* 2009).

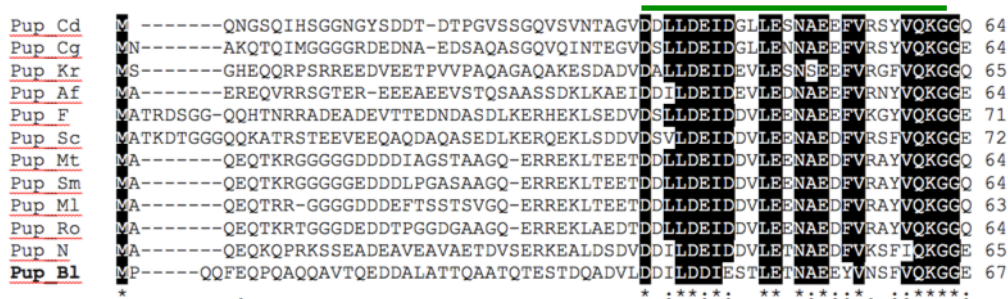


Figura 17. Alineamiento de proteínas Pup de diferentes especies de actinobacterias, se incluye la secuencia de *B. longum*. Los aminoácidos conservados están marcados en negro. Secuencias: Af-*Acidimicrobium ferrooxidans* (YP_003109527.1), Kr-*Kineococcus radiotolerans* (YP_001361622.1), Cd-*Corynebacterium diphtheriae* (YP_005127660.1), Cg-*Corynebacterium glutamicum* (NP_600711.1), Ro-*Rhodococcus opacus* (YP_002777775.1), Sm-*Mycobacterium smegmatis* (YP_888186.1), Ml-*Mycobacterium leprae* (NP_301949.1), Mt-*Mycobacterium tuberculosis* (NP_216627.1), F-*Frankia* (WP_009737786.1), Sc-*Streptomyces coelicolor* (NP_625921.1), Bl-*Bifidobacterium longum* (YP_002323564.1) and N-*Nocardia farcinica* (YP_119384.1).

El análisis comparativo entre las secuencias de aminoácidos de proteínas Pup provenientes de distintos organismos, muestra que existe un alto porcentaje de similitud con la proteína Pup de *B. longum*, algunas de estas proteínas pertenecen a los géneros de *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus*. Alrededor de 25 aminoácidos entre estas secuencias están conservados (Tabla 4), estos aminoácidos corresponden a los localizados en la región C-terminal que es la más conservada en estas proteínas.

Tabla 4. Porcentajes de identidad y similitud entre proteínas Pup.

Proteínas Pup	N/BI	Cd/BI	Cg/BI	Ro/BI	Mt/BI	Sm/BI	Kr/BI	Af/BI	MI/BI	F/BI	Sc/BI
Tamaño del alineamiento	67	67	67	67	67	67	67	67	67	71	72
Residuos idénticos	29	25	26	25	24	25	23	23	21	21	25
Residuos similares	13	15	13	13	14	11	13	12	14	16	11
% identidad	43.28	37.31	38.81	37.31	35.82	37.31	34.33	34.33	31.34	29.58	34.72
% similitud	62.69	59.70	58.21	56.72	56.72	53.73	53.73	52.24	52.24	52.11	50.00
SMS (Sequence manipulation suite). Secuencias: Af- <i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> (YP_003109527.1), Kr- <i>Kineococcus radiotolerans</i> (YP_001361622.1), Cd- <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (YP_005127660.1), Cg- <i>Corynebacterium glutamicum</i> (NP_600711.1), Ro- <i>Rhodococcus opacus</i> (YP_002777775.1), Sm- <i>Mycobacterium smegmatis</i> (YP_888186.1), MI- <i>Mycobacterium leprae</i> (NP_301949.1), Mt- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (NP_216627.1), F- <i>Frankia</i> (WP_009737786.1), Sc- <i>Streptomyces coelicolor</i> (NP_625921.1), BI- <i>Bifidobacterium longum</i> (YP_002323564.1) and N- <i>Nocardia farcinica</i> (YP_119384.1).											

3.2.2 Amplificación y clonación del gen *blon_2125*

La secuencia nucleotídica que codifica a la proteína Pup se amplificó y se clonó el producto de 201 pb en el vector TOPO 4, posteriormente se realizó una digestión del plásmido (TOPO 4+*pup*) y se subclonó al plásmido de expresión pET28a(+) regulado por el promotor T7 (Figura 18 a,b). Se confirmó la identidad de la construcción pET28a+*pup* por secuenciación del ADN.

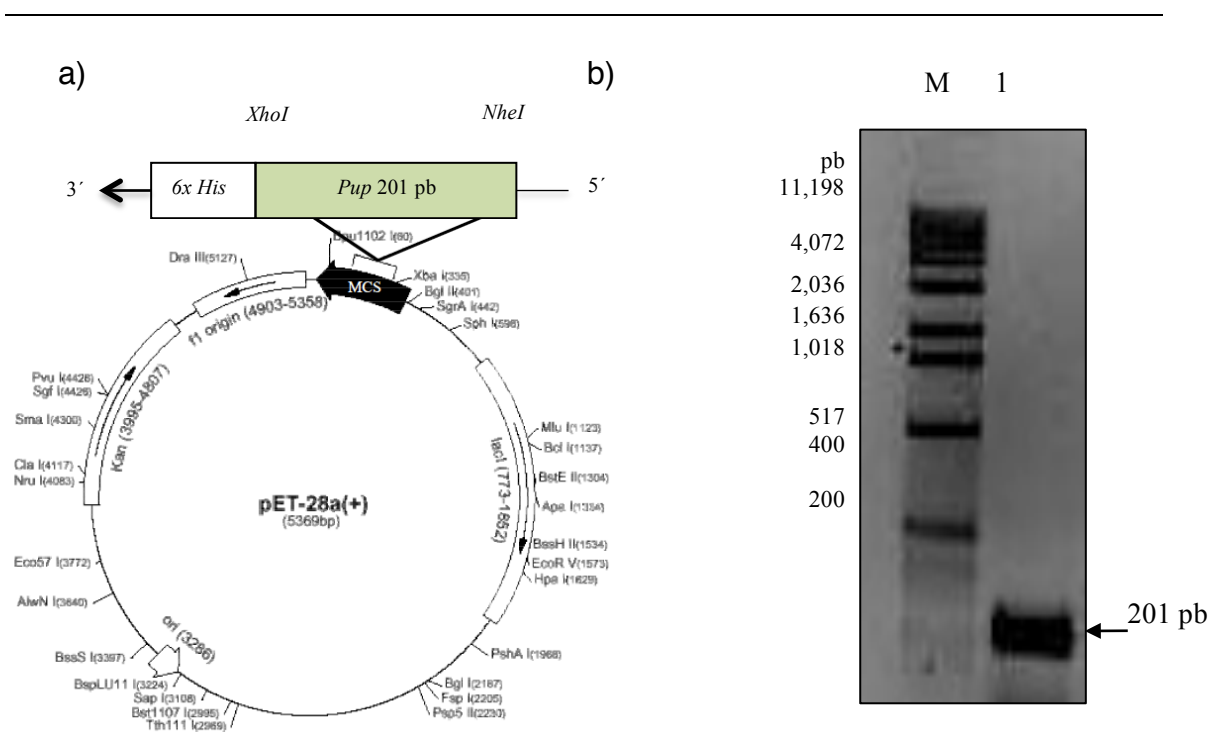


Figura 18. Subclonación del ORF del gen *pup*. A) Representación esquemática de la construcción *pup+pET28a(+)*. B) Amplificación del inserto en la construcción *pET28a+pup*.

3.2.3 Expresión heteróloga de Pup

La expresión de la proteína Pup se indujo con IPTG y la proteína recombinante se observó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% (Figura 19a), además se confirmó la identidad de la proteína por medio de Western blot con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la etiqueta de histidinas (6XHis) (Figura 19b).

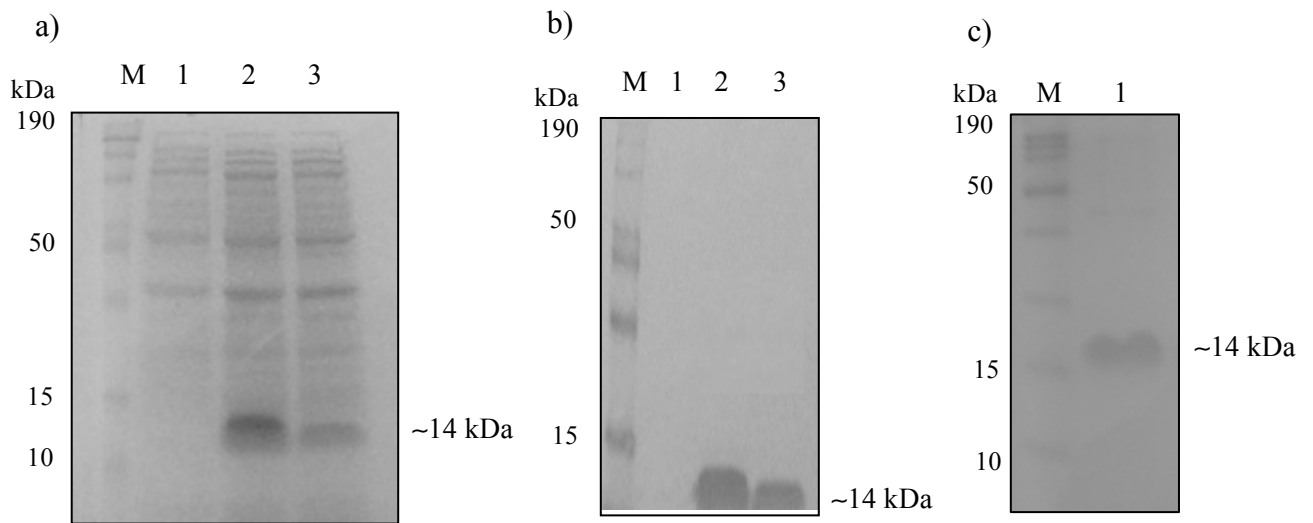
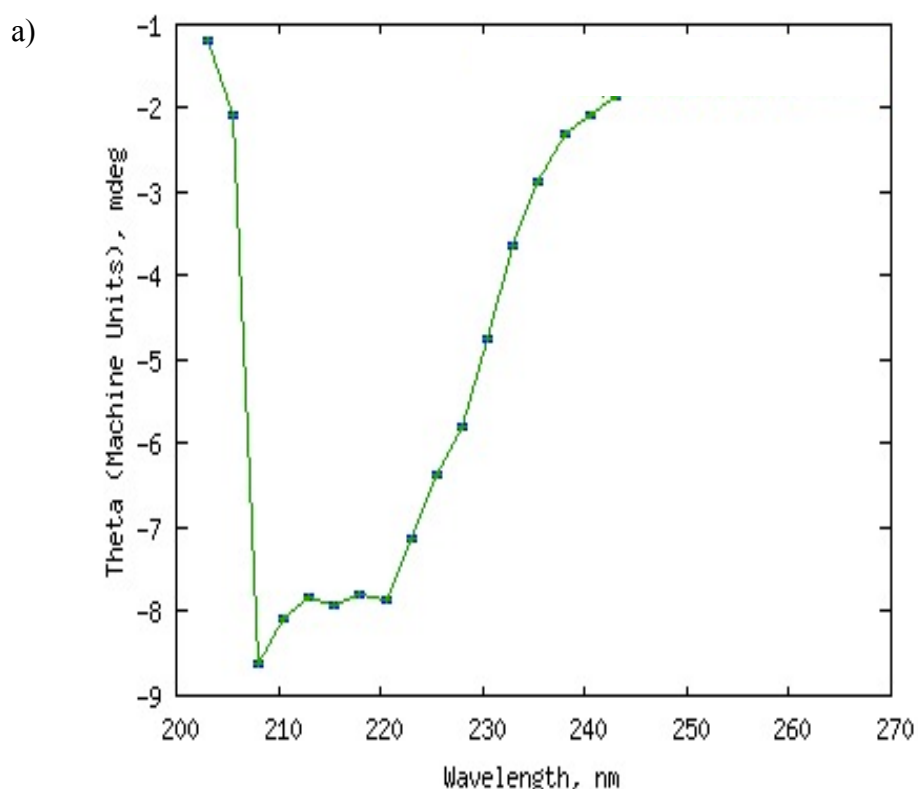


Figura 19. Expresión de la proteína Pup en *E. coli* BL21pLysS. a) Tinción Coomassie, gel desnaturalizante 12 %. M) Marcador de peso molecular en kDa. 1) Control negativo BI-ARC-pET28a+ sin inducir, 2) 8 h después de la inducción, 3) 4 h después de la inducción. b) Western blot de la proteína Pup en condiciones desnaturalizantes. M) Marcador de peso molecular en kDa, 1) Control negativo BI-ARC-pET28a+ sin inducir, 2) 8 h después de la inducción, 3) 4 h después de la inducción. c) Purificación de Pup por Ni-NTA. Tinción Coomassie de la proteína purificada Pup en un gel desnaturalizante 12%. M) Marcador de peso molecular en kDa, 1) Pup.

Una vez estandarizado el protocolo de expresión, se realizó la purificación de la proteína (Figura 19c) por cromatografía de afinidad con Ni^{+2} . Se esperaba una proteína pura de 7kDa de peso molecular teórico calculado. Sin embargo, en electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se visualizó que la proteína migró a través del gel con un peso molecular mayor al esperado (~14kDa), esta característica se encontró en la proteína Pup de *M. tuberculosis*, se atribuye este comportamiento a proteínas poco estables en su estructura (denominadas proteínas “desordenadas”) (Chen *et al.* 2009; Liao *et al.* 2009).

3.2.4 Dicroísmo circular

Con la finalidad de obtener más información sobre la estructura secundaria de la proteína Pup, se obtuvo el espectro de dicroísmo circular, este análisis mostró una marcada tendencia hacia las unidades negativas del espectro, con el mínimo alcanzado alrededor de los 210 nm, este comportamiento ha sido descrito para la proteína Pup de *Mycobacterium* (Liao *et al.* 2009) (Figura 20a). Además este tipo de espectros se han observado en proteínas que mantienen estructuras aleatorias (Zorn *et al.* 2004; Kelly *et al.* 2005; Whitmore and Wallace, 2004-2008). Además del análisis por dicroísmo circular, la secuencia en aminoácidos de la proteína Pup se sometió al software de predicción de patrones de desorden disponible en línea (Disorder prediction RONN) y los datos mostraron que Pup es una proteína que posee una extensa región de poca estabilidad estructural (Figura 20b) (Thomson and Esnouf, 2004; Yang *et al.* 2005; Thomson *et al.* 2003).



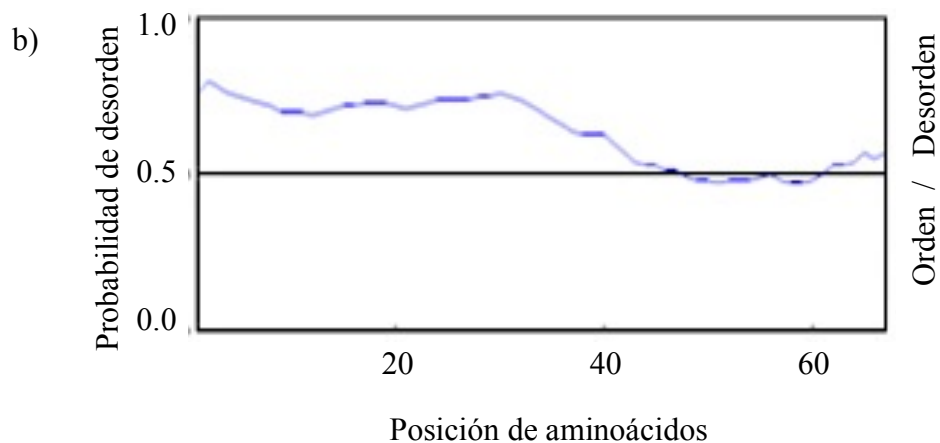


Figura 20. Espectros que muestran la tendencia al desorden de la proteína Pup. a) Espectro del dicrosimo circular de la proteína Pup. b) Análisis de la probabilidad de desorden en la secuencia de aminoácidos de la proteína Pup, en donde cualquier región mayor a 0.5 es considerada como uan región desordenada.

La naturaleza desordenada de la proteína, correlaciona con el hecho de facilitar el movimiento de las proteínas Pup, con la finalidad de favorecer su reconocimiento y ensamble en el bucle de la ATPasa.

3.2.5 Modelado en 3D de Pup

La predicción de la estructura secundaria de Pup indica la formación de hélices α en la parte C-terminal. En esta región se encuentra el patrón conservado de aminoácidos cargados e hidrofóbicos, además también presenta una tendencia a formar estructuras “coiled-coil” (Figura 21).

importante es que para que ocurra la unión de Pup no es necesaria su región N-terminal completa (primeros 20 aminoácidos), ya que el contacto puede ocurrir entre los aminoácidos 45-60 (Figura 22) (Wang *et al.* 2010).

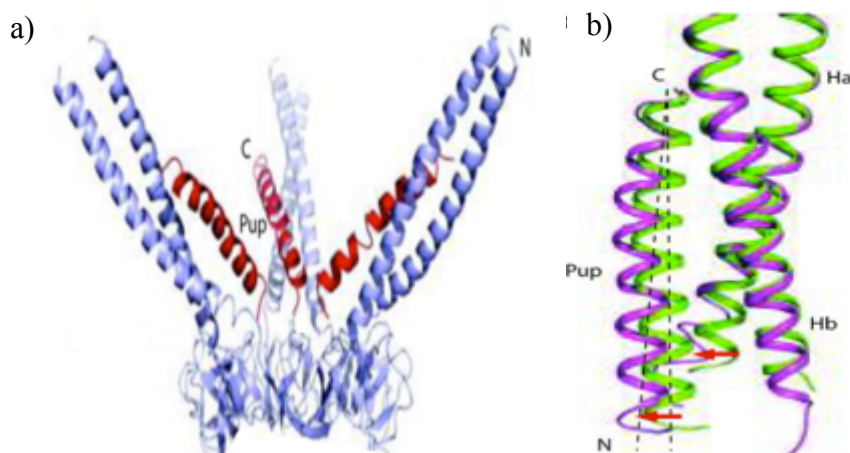


Figura 22. Complejo formado entre Mpa y Pup. a) Estructura de Mpa 1-234 aa (azul) en complejo con tres proteínas Pup (rojo), donde Pup forma estructuras en hélice α que aparentemente interactúan con los bucles sobresalientes del dominio N-terminal de Mpa. b) Alineamiento de las estructuras Pup (morado) Mpa 1-234 aa (verde), se observa la interacción de Pup con los bucles del dominio N-terminal de Mpa. En flechas rojas se señala el movimiento de Pup para ser enrollada a Mpa (Modificado de Wang, 2010).

3.2.6 Coinmunoprecipitaciones

Las interacciones entre proteínas son importantes en muchos procesos biológicos. Esto por que las proteínas pueden interactuar para formar complejos proteínicos que participen en procesos celulares fundamentales como el transporte de proteínas o que ocurran interacciones para modificar a otra proteína. Las interacciones proteína-proteína son un punto clave en los procesos celulares. Por lo tanto, la información inherente a estas interacciones amplía el conocimiento y proporciona las bases para nuevos enfoques en el estudio de los mecanismos en las células (Phizicky and Fields 1995).

Por lo que el estudio del proteoma de los organismos es fundamental ya que brinda información sobre proteínas que son expresadas en un momento concreto

bajo condiciones establecidas, así como la interacción entre ellas, lo que permite una sincronización y funcionalidad de múltiples procesos en el interior de las células.

Con la finalidad de establecer las interacciones entre proteínas en *B. longum*, se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación. Las proteínas ARC y Pup se fijaron con el anticuerpo anti-His a las esferas de sefarosa; ambas se incubaron con extractos totales de proteínas provenientes de la cepa de *B. longum*. En geles desnaturalizantes se identificaron proteínas que interaccionaron en ambos casos (ARC/Pup). Las proteínas aisladas se analizarán por espectrometría de masas para su identificación (Figura 23).

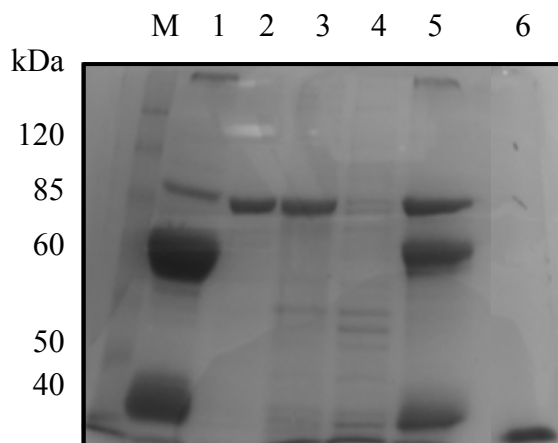


Figura 23. Coimmunoprecipitaciones con extractos de células de *B. longum*. M) Marcador de peso molecular, 1) Anticuerpo anti-His, 2) BI-ARC purificada, 3) BI-ARC + extracto soluble de *B. longum*, 4) Pup + Extracto soluble de *B. longum*, 5) BI-ARC+ anti-His, 6) Pup purificada.

3.3 Dop y PafA proteínas accesorias del sistema de pupilación en *B. longum* subsp. *infantis*.

3.3.1 Alineamientos y estructura secundaria

Las proteínas que participan en la deamidación de Pup y su ligación a los sustratos (Dop y PafA, respectivamente) son proteínas globulares y están relacionadas con la familia de las ligasas amino-carboxilasas. Esta familia de proteínas cataliza la formación de enlaces isopeptídicos a través de un intermediario fosforilado (Guth *et al.* 2011).

En el genoma de *B. longum* se identificaron dos marcos de lectura abiertos que corresponden a homólogos de las proteínas Dop y PafA de algunas actinobacterias. Un alineamiento en secuencias de aminoácidos mostró que ambas proteínas mantienen conservadas las regiones N-terminal y C-terminal, mientras que en la parte central se destacan las regiones que corresponden a los sitios catalíticos para cada una (PafA en verde y Dop en amarillo) (Figura 24).

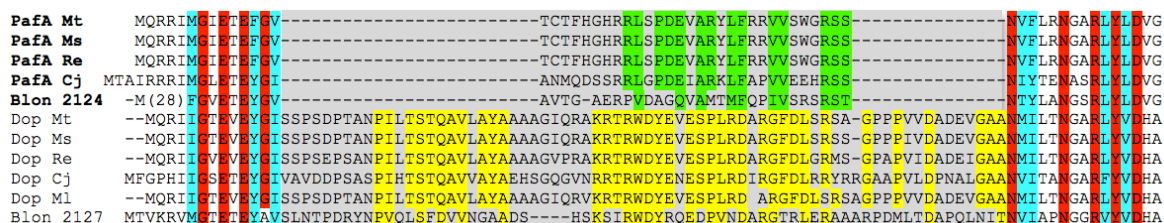


Figura 24. Alineamiento en secuencia de aminoácidos de PafA y Dop de miembros representativos de actinobacterias (Clustal W). Las líneas de aminoácidos marcados en colores azul y rojo representan regiones conservadas, mientras que la región que comprende los aminoácidos del 27 al 90 marcada en gris determina a qué miembro pertenece la proteína, ya sea a la familia PafA (verde) o Dop (amarillo).

La proteína Dop de *M. smegmatis* comparte un mayor porcentaje de identidad con la proteína Dop de *B. longum*. En la Tabla 5 se observa que la variación es mínima entre los porcentajes de similitud e identidad entre proteínas Dop de actinobacterias.

Tabla 5. Porcentajes de identidad y similitud entre proteínas Dop.				
Proteínas Dop	Ms/Blon	Re/Blon	Mt/Blon	Cj/Blon
Tamaño del alineamiento	563	563	610	562
Residuos idénticos	206	199	209	180
Residuos similares	96	100	100	98
% identidad	36.59	35.35	34.26	32.03
% similitud	53.64	53.11	50.66	49.47
SMS (Sequence manipulation suite). Secuencias: Mt- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (NP_216628.1), Ms- <i>Mycobacterium smegmatis</i> (A0QZ49.1), Re- <i>Rhodococcus erythropolis</i> (Q53081.), Cj- <i>Corynebacterium jeikeium</i> (YP_250729.1), Blon- <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> (YP_002323566.1).				

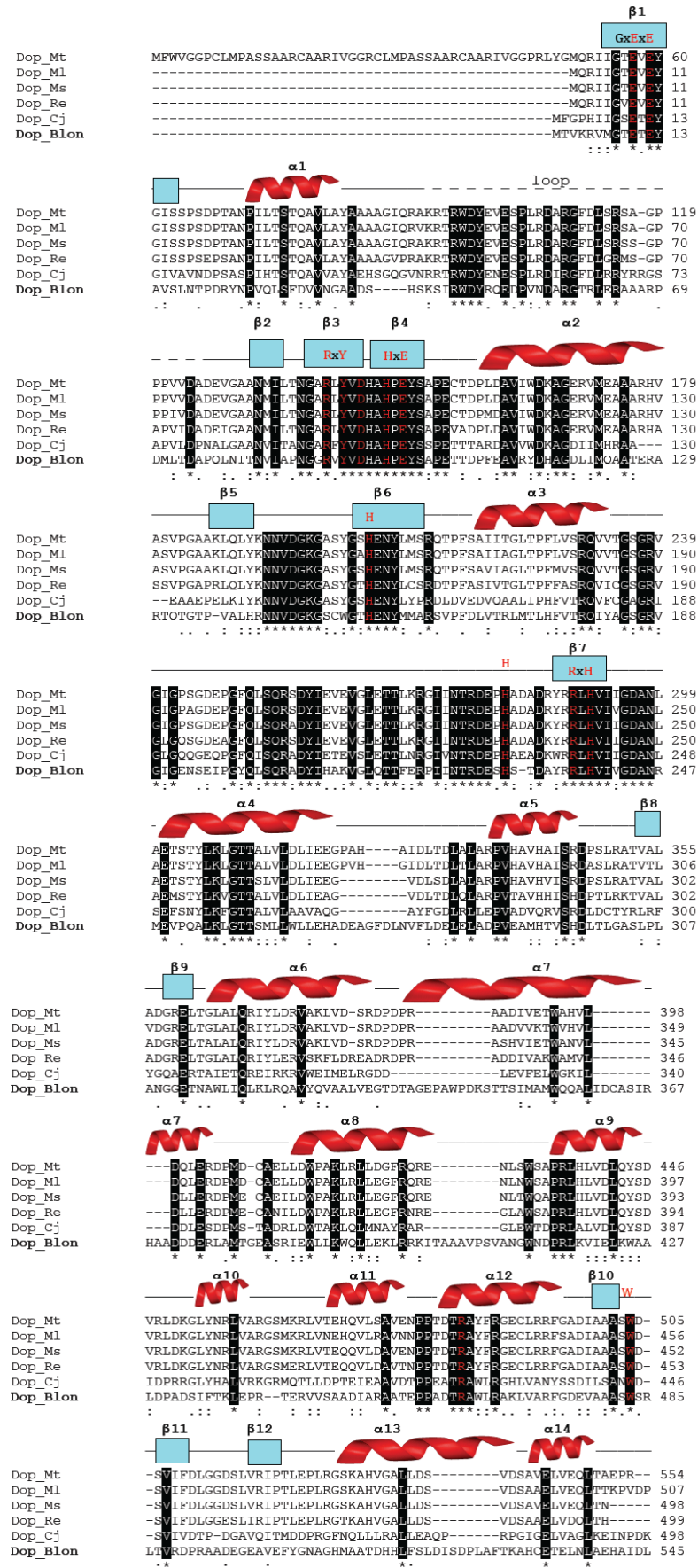
Por otro lado, en las secuencias de aminoácidos de proteínas PafA, encontramos la misma tendencia en los porcentajes de similitud e identidad que en las proteínas Dop. Aunque en este caso la proteína con mayor coincidencia en aminoácidos con la de *B. longum* fue la enzima de *R. erythropolis* (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentajes de identidad y similitud entre proteínas PafA.				
Proteínas PafA	Re/Blon	Mt/Blon	Ms/Blon	Cj/Blon
Tamaño del alineamiento	492	492	492	503
Residuos idénticos	188	186	183	181
Residuos similares	82	84	82	92
% identidad	38.21	37.80	37.20	35.98
% similitud	54.88	54.88	53.86	54.27
SMS (Sequence manipulation suite). Secuencias: Mt- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (NP_216613.1), Ms- <i>Mycobacterium smegmatis</i> (ELQ88190.1), Re- <i>Rhodococcus erythropolis</i> (EEN85243.1), Cj- <i>Corynebacterium jeikeium</i> (EEW16480.1), Blon- <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> (YP_002323563.1).				

Se analizaron las estructuras secundarias para Dop y PafA. En estas estructuras se observaron regiones consenso entre proteínas, identificándose sitios activos y de unión a ATP (Figura 25).

En ambas estructuras se observan dominios de interacción. El dominio N-terminal que comprende los primeros residuos en ambas proteínas, es un dominio muy relacionado al que poseen las enzimas carboxilato-amino ligasas. Este dominio en Dop y PafA está constituido por láminas β centrales y láminas β antiparalelas, formando una superficie cóncava, rodeada de un grupo de α -hélices sobre la parte posterior de las láminas β (Figuras 26 y 27).

a)



[illegible]

Figura 25. Estructuras secundarias de las proteínas Dop y PafA de *B. longum*. a) Alineamiento de proteínas Dop. Secuencias: Mt-*Mycobacterium tuberculosis* (NP_216628.1), Ml-*Mycobacterium leprae* (NP_301948.1), Ms-*Mycobacterium smegmatis* (A0QZ49.1), Re-*Rhodococcus erythropolis* (Q53081.1), Cj-*Corynebacterium jeikeium* (YP_250729.1), Blon-*Bifidobacterium longum* (YP_002323566.1). b) Alineamiento de proteínas PafA. Secuencias: Mt- *Mycobacterium tuberculosis* (NP_216613.1), Ms-*Mycobacterium smegmatis* (NP_216613.1), Re- *Rhodococcus erythropolis* (EEN85243.1), Cj- *Corynebacterium jeikeium* (EEW16480.1) and Blon- *Bifidobacterium longum* (YP_002323563.1). Los elementos de la estructura secundaria se muestran en la parte superior de las secuencias; las hélices α marcadas en rojo y las láminas β en azul, los aminoácidos conservados se resaltan en negro.

El dominio que distingue a estas dos enzimas está localizado en una fracción de 70 aminoácidos dentro de la región C-terminal. Esta porción se encuentra estructurada por tres láminas β (β 10-12) recubiertas por algunas α -hélices (Dop: α 12, α 13 y α 14 - PafA: α 12 y α -13') (Figura 25).

3.3.2 Características estructurales de las proteínas Dop y PafA

Para conocer la estructura tridimensional de ambas enzimas en *B. longum*, se realizó el modelaje por homología. Se usó como templado la estructura del cristal de la proteína Dop de *Acidothermus cellulolyticus* (PDB: 4B0R) para modelar la proteína Dop de *B. longum*; con un C-score de 0.85, una TM de 0.83 y un RMSD de 5.7 Å.

El modelo para la proteína PafA se generó a partir de la estructura cristalográfica de la enzima PafA de *Corynebacterium glutamicum* (PDB: 4B0T); con un C-score de 0.84, una TM de 0.83 y un RMSD de 5.4 Å.

En las Figuras 26 y 27 se observa la sobreposición de las estructuras. Es posible apreciar la alta homología estructural que existe en cada uno de los modelos (Dop de *B. longum* en azul y Dop de *A. cellulolyticus* en rosa; PafA de *B. longum* en verde y PafA de *C. glutamicum* en naranja).

En el caso de la proteína Dop observamos que conserva la estructura de las hélices α 1, 2 y 4, que están presentes en la estructura del cristal de Dop de *A. cellulolyticus* (Figura 26c). Las láminas β coincidentes son: 1, 3, 4, 6, 11 y 12 (Figura 26 b).

Por otro lado, las láminas β 2, 7 y 10 que aparecen en la estructura Dop de *A. cellulolyticus* (Figura 26a), se observan en la estructura de Dop en *B. longum* siguiendo una estructura similar al cristal (Figura 26b).

La región marcada en el óvalo amarillo de la Figura 26b, es una porción de la proteína donde se forma el bucle en la lámina β 2 (Dop-loop) que aparece en el alineamiento de la Figura 25a y que en la estructura del cristal lo marcan como regiones que no fueron definidas en la estructura cristalográfica (región punteada). Aun se desconoce su función, ya que deleciones en este bucle muestran actividad tanto de deamidasa como depupilasa en esta proteína (Ozcelik *et al.* 2012).

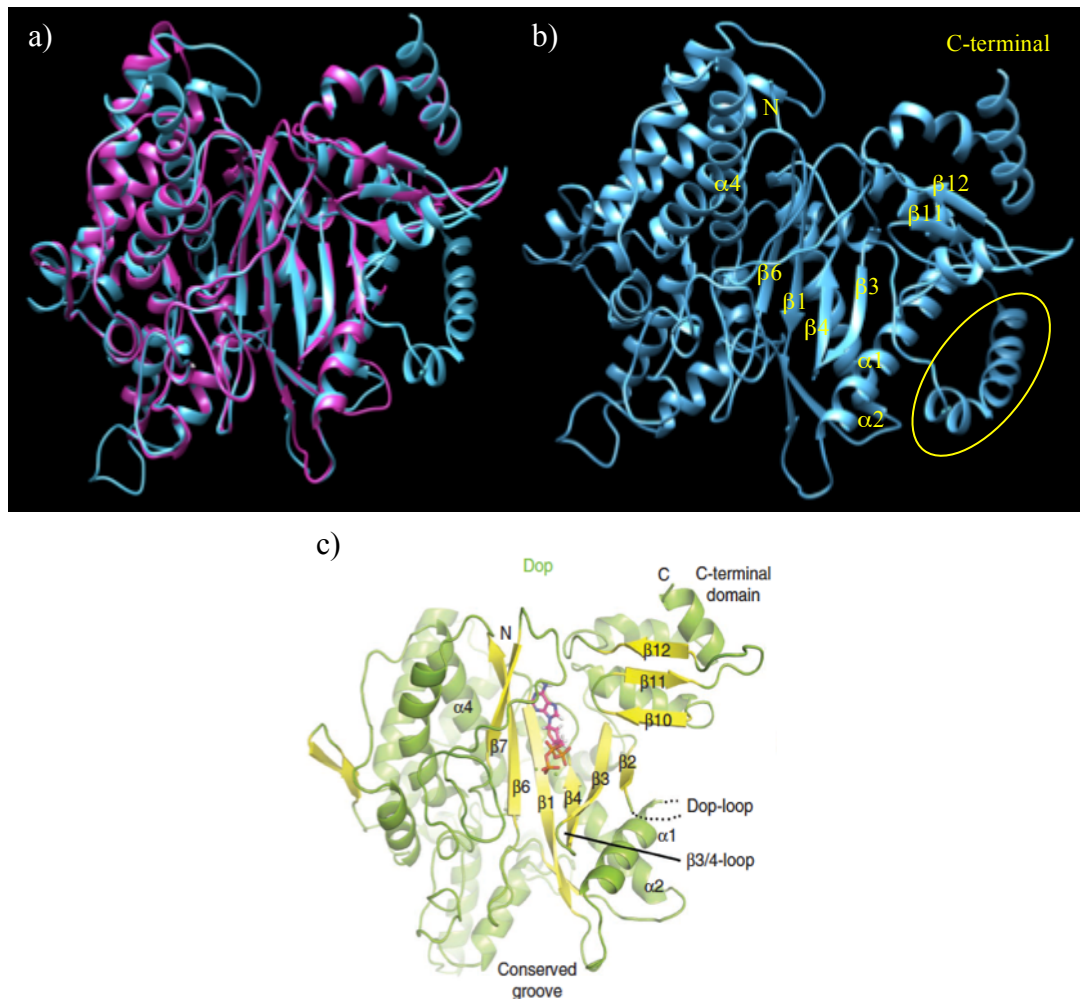


Figura 26. Modelado de estructuras de proteínas Dop en *B. longum*. a) Sobreposición del cristal de la proteína Dop de *A. cellulolyticus* (PDB: 4B0R en rosa) con la estructura de Dop de *B. longum* subsp. *infantis* (Blon_2127 en azul), b) Predicción de la estructura de la proteína Dop de *B. longum* subsp. *infantis* (Blon_2127), c) Cristal de Dop de *A. cellulolyticus* (PDB: 4B0R). Algunas α -hélices y láminas β están señaladas en las estructuras.

Para el caso de la proteína PafA, observamos que está presente el bucle β 3/4 en el modelo para *B. longum* señalado con la flecha roja. También se encontró la hélice α 3' (Figura 27b).

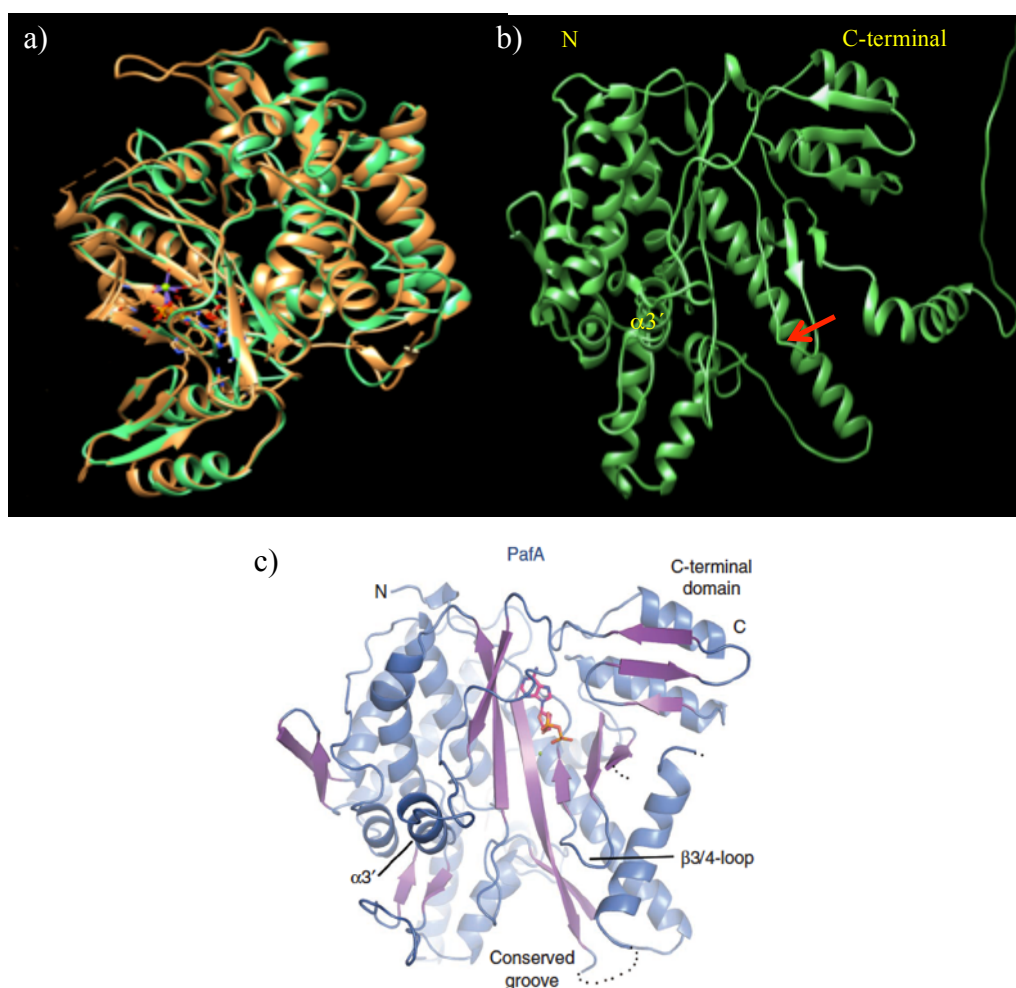


Figura 27. Modelado de estructuras de proteínas PafA en *B. longum*. a) Sobreposición del cristal de la proteína PafA de *C. glutamicum* (PDB: 4B0T en naranja) con la estructura de PafA de *B. longum* subsp. *infantis* (Blon_2124 en verde), b) Predicción de la estructura de la proteína Dop de *B. longum* subsp. *infantis* (Blon_2124), c) Cristal de PafA de *C. glutamicum* (PDB: 4B0T).

3.3.3 Modelo de unión al ATP y sitio activo de Dop y PafA

Se ha descrito que el sitio de unión al ATP de estas dos enzimas está localizado en la región cóncava central de sus estructuras, formada entre los plegamientos de las láminas β (Figuras 26 y 27).

Además se ha reportado que la adenina del nucleótido del ATP se aloja en un sitio altamente hidrofóbico, este sitio está formado por la lámina $\beta 1$, $\beta 6$ y por el bucle conservado que precede a la lámina $\beta 7$, así como el bucle que proviene del dominio C-terminal.

También se han estudiado de manera puntual los aminoácidos que interactúan con el ATP y Mg^{+2} , así como algunas mutaciones que reflejan cambios en la actividad de estas proteínas, algunos de ellos se enlistan en la Tabla 7. En nuestros análisis encontramos que estos aminoácidos también están conservados en las proteínas Dop y PafA de *B. longum*.

Tabla 7. Aminoácidos conservados en las proteínas Dop y PafA		
Aminoácidos conservados		Descripción
Proteína Dop	Proteína PafA	
R433	R418	Interactúan con la adenina del ATP
W453	W440	Flanquean la adenina y mantienen contacto con la ribosa del ATP
R90, R227 y R239	R 60 y R219	Neutralizan las cargas de los fosfatos del ATP
E8 y E10	E16 y E18	Unión a iones Mg^{+2} y unión al ATP
E99	E70	Coordinación del Mg^{+2}
H155 y H241	H130 y H221	Coordinan la posición del Mg^{+2}
R205	R185	Posicionan el dominio C-trminal de Pup en los sitios activos de Dop y PafA
Q139 y R400		Sustituciones con ácido glutámico en estos residuos impiden la unión de Pup, además de impedir la actividad de depupilación
K148		Sustitución de este residuo por alanina impide la actividad de depupilación
	L376	Sustitución de este residuo con ácido glutámico impide la ligación de proteínas Pup

Otro de los sitios importantes en estas enzimas, es el sitio en el que ocurre la unión al dominio C-terminal de Pup, éste se localiza en el residuo de glutamato ubicado al final de las láminas β en la estructura cóncava de las proteínas (Dop y PafA), cercano al dominio N-terminal de la lámina β_6 (Eisenberg *et al.* 2000).

Además de las semejanzas, también existen algunas diferencias entre los mecanismos de Dop y PafA. En el caso de la proteína PafA es necesario que ocurra la activación del γ -carboxilo del dominio C-terminal del glutamato en Pup, con la formación de un intermediario fosforilado, para que ocurra la ligación, esto debido a que los aniones hidroxilo no son un buen grupo donador de electrones.

Para el caso de la deamidación y depupilación realizada por la proteína Dop, no es necesario que ocurra esta activación, debido a que el amonio o aminos son mejores donadores de electrones (Peter y Vollhardt 1994).

Este análisis entre las Dop y PafA establece que aunque existe homología entre ambas, hay una clara diferencia entre las reacciones que catalizan en la vía de la pupilación.

3.4 Predicción de Pupilación en *B. longum* subsp. *infantis*

3.4.1 Identificación de proteínas susceptibles de pupilación en el proteoma completo de *B. longum* subsp. *infantis*.

Existen una serie de programas disponibles que permiten hacer determinaciones de regiones consenso que predicen regiones asociadas a ciertos eventos en las proteínas. En la actualidad se han desarrollado programas que identifican sitios de ubiquitinación (Chen *et al.* 2011), fosforilación (Zhao *et al.* 2012), sumoilación (Melchior 2000) y determinación de regiones flexibles y rígidas (Chen *et al.* 2007). Recientemente se publicó un programa capaz de predecir sitios de pupilación en proteínas (Tung 2013). Este programa está basado en la predicción de residuos de lisinas en las que puede ocurrir la pupilación; las determinaciones se realizan bajo la ejecución de una serie de algoritmos que reconocen una secuencia particular de aminoácidos (k-spaced, CKSAAP) (Tung 2013). Esta secuencia fue tomada como una región consenso entre proteínas pupiladas, las cuales se determinaron de manera experimental y se encuentran reportadas en una base de datos (PupDB a database of pupylated proteins).

Los resultados son desplegados en una ventanilla en la que se muestra el nombre completo de las proteínas, seguido de la posición de la lisina en la secuencia, después la secuencia donde se ubica la lisina encontrada y finalmente el puntaje que determina la probabilidad de que sea un sitio blanco de pupilación (Tabla 8).

Tabla 8. Puntajes para determinar los sitios de pupilación	
Score	Probabilidad de ser un sitio para pupilación
0.1167 < score	elevado
0.1044 < score < 0.1167	intermedio
0.0963 < score < 0.1044	bajo
Score < 0.0963	No existe sitio de pupilación

Con esta herramienta se hizo la búsqueda de proteínas blanco a población en el proteoma (2,552 proteínas) de *B. longum* subsp. *infantis* (NCBI bioproject, Tabla 9).

Tabla 9. Proyecto de secuenciación de <i>B. longum</i>				
Organismo	BioProject	Tamaño (Mb)	GC%	Proteínas
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697	PRJNA159865, PRJDA32049	2.83	59.9%	2,552

De los resultados obtenidos, se seleccionaron las proteínas que mostraron puntajes mayores o iguales a 0.1167. En la Figura 28, se muestra un gráfico con la agrupación de las proteínas identificadas de acuerdo a su función. El mayor número de proteínas encontradas pertenecen al grupo de proteínas con función putativa o hipotética, esto debido a que prácticamente no se han caracterizado las proteínas en esta bacteria. Sin embargo, también se encontraron proteínas involucradas en metabolismo y respiración en un porcentaje del 18.17% y otras proteínas de pared celular en un 12.82%; este tipo de proteínas han sido reportadas en *M. tuberculosis* (Poulsen *et al.* 2010).

Las proteínas que aparecen en menor porcentaje, participan en virulencia, detoxificación y adaptación, metabolismo de lípidos, fagos y proteínas reguladoras.

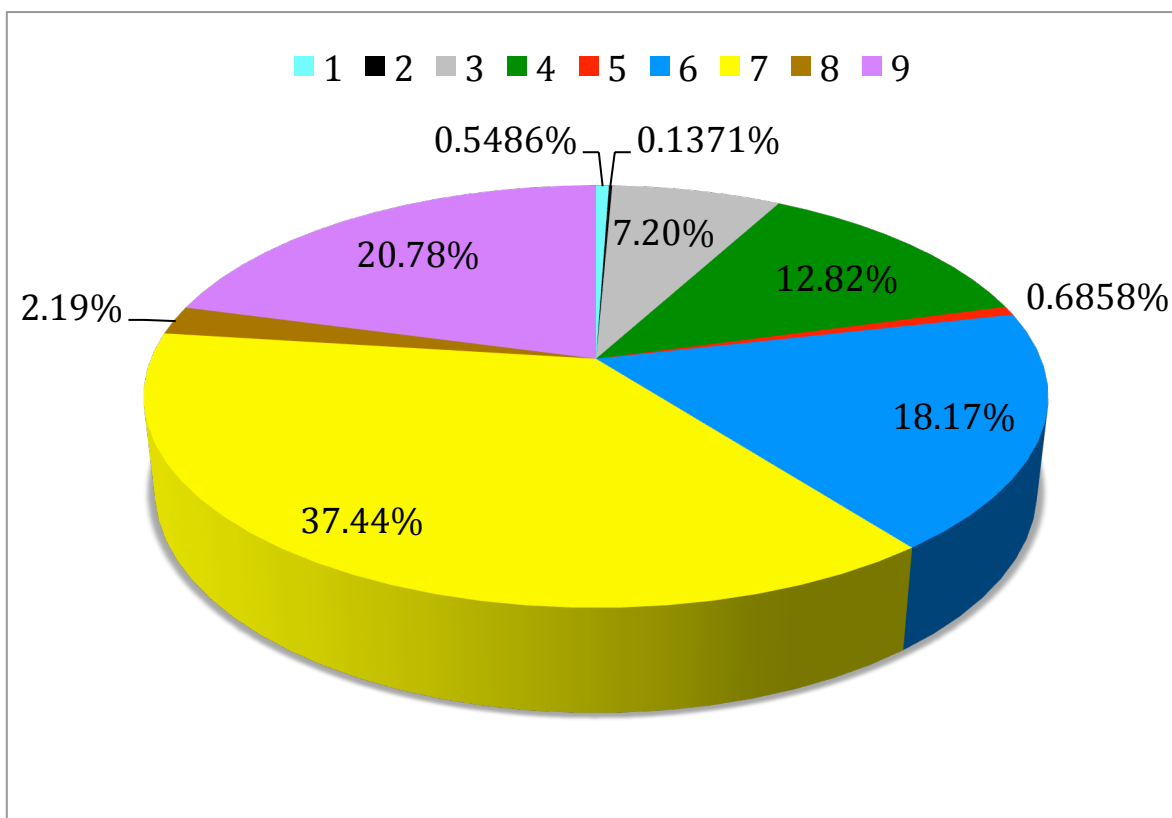


Figura 28. Clasificación de las proteínas blanco a ser pupiladas en *B. longum*. Distribución de las proteínas candidatas divididas en distintas categorías (Camus *et al.* 2002): 1) virulencia, detoxificación y adaptación, 2) metabolismo de lípidos, 3) Rutas de información, 4) Pared celular y procesos, 5) Fagos, 6) Metabolismo y respiración, 7) Proteínas hipotéticas, 8) Proteínas reguladoras, 9) Proteínas con función putativa. Total de proteínas 2552 en *B. longum* (NCBI: PRJDA32049), de las cuales 1458 proteínas candidatas para pupilación.

En la Tabla 10 se enlistan los nombres de las proteínas blanco a pupilación que se encontraron en *B. longum* subsp. *infantis*, todas estas proteínas presentaron puntajes mayores o iguales a 0.1167, que el programa considera como una puntuación alta en su predicción.

En una comparación entre proteínas pupiladas reportadas en *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *R. erythropolis* y *C. glutamicum*, encontramos proteínas pupiladas que se comparten entre estos microorganismos y *B. longum*.

Dichas proteínas son: ribosoma 50S L11/chaperonina GroEL (*B. longum*, *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*), acetolactato sintasa/Glioxalasa (*B. longum*, *C. glutamicum* y *M. smegmatis*), S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa/aspartato aminotransferasa / pirofosfatasa inorgánica (*B. longum*, *C. glutamicum* y *R. erythropolis*), factor de elongación G (*B. longum*, *C. glutamicum* y *M. tuberculosis*) y factor de elongación Ts (*B. longum*, *R. erythropolis* y *M. smegmatis*).

Estas proteínas están involucradas en procesos como traducción de proteínas, elongación, control de calidad, síntesis de aminoácidos y metabolismo.

La pupilación parece ser un mecanismo fundamental en la sobrevivencia de *M. tuberculosis* frente a eventos de estrés oxidativo durante la infección en modelos animales (Darwin *et al.* 2003).

En *B. longum* es un tema de estudio interesante, ya que la preservación de este mecanismo pudiera estar involucrada en la regulación de mecanismos tan importantes como en las micobacterias.

Tabla 10. Pupiloma en *B. longum*

Proteína	Proteína	Proteína	Proteína
1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	Clp protease	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	Pseudouridine synthase
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	Co-chaperonin GroES	Inositol monophosphatase ✓	PTS system enzyme I
16S rRNA-processing protein	Co/Zn/Cd cation transport protein	Isoamylase	PTS system glucose-specific IIBC components
2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase	CoA-substrate-specific enzyme activating protein	Isocitrate dehydrogenase	PTS system N-acetylglucosamine-specific IIA component
2-isopropylmalate synthase	Cobyrinic acid synthase CobQ	Isoleucyl-tRNA synthase	PTS system N-acetylglucosamine-specific IIBC components
2,5-didehydrogluconate reductase	Cold shock protein	Isoprenyl diphosphate synthase	Pyridine nucleotide-disulfideoxidoreductase
2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase	Coproporphyrinogen III oxidase	Isopropylmalate isomerase large subunit *	Pyridoxine kinase
3-dehydroquinate dehydratase	Cystathionine beta-lyase	Ketol-acid reductoisomerase *	Pyrophosphohydrolase
3-isopropylmalate dehydrogenase	Cystathionine gamma-synthase	Kinase	Pyrrolidone-carboxylate peptidase
30S ribosomal protein S3, S2, S5, S6✓, S8, S9, S11, S15, S16, S17✓, S19, S20	CysteinyI-tRNA synthetase	L-aspartate oxidase	Pyrroline-5-carboxylate reductase
4-alpha-glucanotransferase	D-alanine--D-alanine ligase	L-lactate dehydrogenase *	Queuine tRNA-ribosyltransferase
4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	Lacto-N-biose phosphorylase	Quinolinate synthase
4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	Dehydrogenase ◇	Leucyl-tRNA synthetase	Recombinase RecA Δ
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate/methyltransferase	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase	Lipase/esterase	Recombination factor protein BarA

5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	Deoxyribonuclease	Lipoate protein ligase	Recombination protein RecF
5'-nucleotidase	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	Lipopolysaccharide biosynthesis protein	Regulatory protein
50S ribosomal protein L1, L4, L7, L9, L10, L11◇✓, L12, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L20, L22, L25, L28, L35, L36	Diaminopimelate epimerase	Lipoprotein signal peptidase	Replication protein
	dipicolinate reductase	Long-chain-fatty acid CoA ligase	
6-phosphogluconate dehydrogenase	Dihydrodipicolinate synthase		Replicative DNA helicase
ABC transporter ATP-binding and permease components	Dihydrolipoamide dehydrogenase Δ	Lysyl-tRNA synthase	Resolvase
ABC transporter ATP-binding protein	Dihydroorotate dehydrogenase	Mandelate racemase/muconate lactonizing protein	Riboflavin kinase
ABC transporter permease	Dihydrouridine synthase	Manganese transport protein	Riboflavin synthase subunit alpha
ABC transporter substrate binding component	Dihydroxy-acid dehydratase	Mannitol dehydrogenase	Ribokinase
Acetolactate synthase large and small subunit *✓	Dimethyladenosine transferase	Metalloendopeptidase	Ribonuclease H
Acetate kinase *	Dipeptidase	Methionine aminopeptidase	Ribonuclease III
Acetylornithine aminotransferase ✓	Dipeptide ABC transporter ATP-binding component	Methionine sulfoxide reductase	Ribonucleoside hydrolase
Acetyltransferase ✓	Dipeptide ABC transporter substrate binding component	Methionyl-tRNA formyltransferase	Ribonucleoside triphosphate reductase
Aconitate hydratase ✓	Dipeptidyl peptidase *	Methionyl-tRNA synthase	Ribonucleotide reductase stimulatory protein
			Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha and beta
Acyl protein synthase/acyl-CoA reductase	DNA gyrase subunit A and B	Methylase	
Acyl-CoA reductase	DNA helicase	Methyltransferase	Ribose-5-phosphate isomerase
Acyl-CoA thioesterase	DNA ligase	Multidrug transport protein	Ribose-phosphate pyrophosphokinase ◇

Acyltransferase	DNA methylase	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	Ribosomal pseudouridine synthase
Adenine phosphoribosyltransferase	DNA mismatch repair protein	N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase	Ribosomal-protein-alanine N-acetyltransferase
Adenylate kinase ◇	DNA polymerase III alpha subunit	NA methylase	Ribosome recycling factor
Adenylosuccinate synthase *	DNA polymerase III subunit delta'	Na ⁺ /galactoside symporter	Ribulose-phosphate 3-epimerase
Adhesin	DNA repair protein	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	RNA methyltransferase
Alanine racemase	DNA repair protein RecO	NAD(P) transhydrogenase alpha-1 subunit	RNA polymerase sigma factor
Alanyl-tRNA synthase	DNA topoisomerase I	NAD(P) transhydrogenase beta subunit	RNA polymerase sigma factor RpoD
Alcohol dehydrogenase ✓	DNA topoisomerase IV subunit A and B ✓	NADH oxidase	RNA polymerase sigma factor RpoE
Aldehyde dehydrogenase	DNA-binding protein	Nickel transport protein	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase* Δ
Alkaline phosphatase	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	Nicotinate phosphoribosyltransferase	S-adenosylmethionine synthase ◇
Alpha-1,3/4-fucosidase	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	Nitrogen regulatory protein	S-ribosylhomocysteinase
Alpha-1,4-glucosidase	Drug transport protein	Nitroreductase	Serine protease inhibitor
Alpha-acetolactate decarboxylase	Elongation factor G * ◇	Nucleosidase	Serine-threonine protein kinase
Alpha-galactosidase	Elongation factor Ts Δ ✓	Nucleoside hydrolase	Seryl-tRNA synthase
Alpha-L-fucosidase	Endonuclease III	O-acetylhomoserine/O-acetylserine sulfhydrylase *	Shikimate kinase
Alpha/beta hydrolase	Enolase *	Oligo-1,6-glucosidase	Signal peptidase
Amidase	Esterase	Oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein	Signal recognition particle protein
Amidohydrolase	Excinuclease ABC subunit C	Oligopeptide ABC transporter permease	Sodium-dicarboxylate symporter

Amidophosphoribosyltransferase	Exodeoxyribonuclease	Oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein	Sodium-solute symporter
Amidotransferase	Exodeoxyribonuclease VII small and large subunit	Oligoribonuclease	Sodium/proline symporter
Amino acid ABC transporter ATP-binding protein	Fatty acid synthase	Oligosaccharide ABC transporter permease component	Sortase
Amino acid ABC transporter permease component	Ferredoxin	Orotate phosphoribosyltransferase	SsrA-binding protein
Amino acid ABC transporter substrate binding component	Ferredoxin/ferredoxin-NADP reductase	Oxidoreductase	Starvation sensing protein
Amino acid transport protein	Flavodoxin	Para-aminobenzoate synthase component	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
Aminotransferase	Folylpolyglutamate synthase	Para-aminobenzoate synthase glutamine amidotransferase	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit
Ammonium ion transport protein	Formate-tetrahydrofolate ligase	Penicillin-binding protein	Succinyl-CoA synthase subunit alpha y beta
Amylase	Fructose-bisphosphate aldolase *	Peptidase	Sucrose phosphorylase
Anthranilate synthase component ✓	Fucose operon protein	Peptide chain release factor	Sugar ABC transporter permease
Arabinogalactan endo-beta-galactosidase	Fucose transport protein	Peptide deformylase	Sugar ABC transporter substrate binding component
Argininosuccinate synthase Δ	Galactokinase	Peptides ABC transporter permease component	Sugar kinase
Arginyl-tRNA synthase	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	Peptides ABC transporter substrate binding component	Sugar transport protein
Aromatic amino acid transport protein	Galactoside transport protein	Peptidoglycan branched peptide synthesis protein	Termination factor Rho
Asparagine synthase	Glucokinase	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Δ	Thiamine biosynthesis protein
Aspartate aminotransferase * Δ	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	Phage antirepressor	Thiamine pyrophosphokinase
Aspartate ammonia-lyase	Glucose-6-phosphate 1-	Phage integrase	Thiol peroxidase

	dehydrogenase ✓		
Aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	Glucose-6-phosphate isomerase*	Phage lysin	Thioredoxin reductase *
Aspartate carbamoyltransferase regulatory subunit	Glucose-inhibited division protein	Phage protein *	Threonine dehydratase
Aspartate kinase	Glucuronate isomerase	Phage terminase	Threonyl-tRNA synthase
Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Glutamate ABC transporter ATP-binding component	Phosphatase	Threonine synthase ✓
Aspartyl-tRNA synthase	Glutamate ABC transporter permease component		Thymidylate synthase
Aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A and B *		Phosphate ABC transporter ATP-binding protein	Transaldolase ✓
	Glutamate ABC transporter substrate binding component	Phosphate ABC transporter permease	Transcription antitermination factor NusB
ATP phosphoribosyltransferase ✓	Glutamate dehydrogenase Δ	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein	Transcription antiterminator
ATP synthase subunit A and B ◇	Glutamate racemase	Phosphate starvation-inducible protein	Transcription elongation factor NusA
ATP synthase subunit delta ✓	Glutamate synthase beta subunit	Phosphate transport protein	Transcriptional regulator
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	Glutamate synthase subunit alpha	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	Transketolase
ATP-dependent DNA helicase PcrA ✓	Glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase	Phosphodiesterase	Translation initiation factor IF-2
ATP-dependent DNA helicase RecQ ✓	Glutamate-cysteine ligase	Phosphoenolpyruvate carboxylase ✓	Translation initiation factor IF-3
ATP-dependent helicase	Glutamyl-tRNA synthetase	Phosphoglucomutase	Transport protein
ATP-dependent nuclease subunit A and B	Glutaredoxin	Phosphoglycerate	Transporter
ATP-dependent RNA helicase	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ✓	Phosphoglycerate kinase *	Transporter permease
ATPase	Glycerate kinase	Phosphoglycerate mutase *	Transposase
Beta-1,3-exoglucanase	Glycerol-3-phosphate ABC	Phosphohydrolase	tRNA (guanine-N1)-

	transporter permease		methyltransferase
Beta-fructofuranosidase	Glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate binding component	Phosphonate ABC transporter permease	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase
Beta-glucosidase	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Phosphonate ABC transporter substrate binding component	Tryptophan synthase subunit alpha and beta
Beta-hexosaminidase	Glycine cleavage system H protein	Phosphopantetheine adenylyltransferase	Tryptophanyl-tRNA synthase
Beta-lactamase	Glycogen phosphorylase	Phosphoribosylamine--glycine ligase	Two-component response regulator
Bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	Glycoside hydrolase	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	Two-component sensor kinase
Branched-chain amino acid ABC transporter ATP-binding component	Glycosyltransferase	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	Tyrosine recombinase
Branched-chain amino acid ABC transporter permease component	Glycyl-tRNA synthase	Phosphoribosylaminoimidazole synthase	UDP-galactopyranose mutase
Branched-chain amino acid ABC transporter substrate binding component	Glyoxalase * ✓	Phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase	UDP-glucose 4-epimerase
Branched-chain amino acid aminotransferase ✓	GTP cyclohydrolase	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	UDP-glucose 6-dehydrogenase
Carbamoyl phosphate synthase large and small subunits	GTP pyrophosphokinase	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase
Carbohydrate kinase	GTP-binding protein	Phosphoserine aminotransferase *	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase ◇
Carbonic anhydrase ✓	GTP-binding protein LepA	Phosphotransferase Δ	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase
Cation-transporting ATPase	GTPase	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	Undecaprenyl pyrophosphate synthase

CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	Guanylate kinase	Polypeptide deformylase	Undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyltransferase
Cell division ATP-binding protein	Heat-inducible transcriptional repressor	Polyphosphate kinase	Uracil-xanthine transport protein
Cell division protein	Helicase	Polysaccharide ABC transporter ATP-binding component	Urease accessory protein UreF
Cell division protein FtsZ	Histidinol dehydrogenase *	Polysaccharide ABC transporter permease component	Urease accessory protein UreG
Cell filamentation protein	Histidinol-phosphate aminotransferase *	Potassium transport protein	Urease accessory protein UreH
Cell surface protein	Histidyl-tRNA synthase	Prephenate dehydrogenase	Urease beta/gamma subunit
Chaperone DnaK	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvA y RuvB	Preprotein translocase subunit SecA	Uridylate kinase
Chaperone GrpE	Holliday junction resolvase	Preprotein translocase subunit SecE	Uridyltransferase
Chaperonin GroEL ◇ ✓	Homoserine dehydrogenase	Primosome assembly protein PriA	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
Choloylglycine hydrolase	Hydrolase	Proline iminopeptidase	Valyl-tRNA synthase
Chorismate synthase	Hydroxyethylthiazole kinase	Prolipoprotein diacylglycerol transferase	Xaa-Pro aminopeptidase
Chromosomal replication initiator protein DnaA	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	Prolyl-tRNA synthase	Xanthine/uracil transport protein
Chromosome partitioning protein ParA and ParB	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	Propionyl-CoA carboxylase alpha and beta subunits	Xylulose kinase
Chromosome partitioning protein Smc	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	Protease	Zinc metallopeptidase
Citrate synthase ◇	Inorganic pyrophosphatase * Δ		
Los cuadros en gris indican las proteínas candidatas a pupilación en <i>B. longum</i> y, que también se han encontrado en <i>M. tuberculosis</i> (◇), <i>C. glutamicum</i> (*), <i>R. erythropolis</i> (Δ) y <i>M. smegmatis</i> (✓).			

4. Conclusiones

Se lograron expresar y purificar las proteínas BI-ARC y Pup en *E. coli*.

La proteína purificada ARC, mostró actividad en presencia de ATP y Mg^{+2} . La energía proporcionada por la hidrólisis del ATP propicia cambios conformacionales en la estructura de la proteína, estos cambios son transformados en fuerza mecánica sobre los sustratos potenciales.

Los ensayos de inhibición en la actividad enzimática, demostraron que la enzima es sensible a N-etilmaleimida; este comportamiento ha sido reportado para otras proteínas AAA, particularmente la proteína ARC de *R. erythropolis*.

La secuencia en aminoácidos de BI-ARC posee un 40% de identidad con proteínas ARC de *R. erythropolis* y *S. coelicolor*. El modelo *in silico*, basado en el cristal de la proteína ARC de *M. tuberculosis*, muestra la formación de una estructura hexamérica. BI-ARC mantiene los motivos canónicos de proteínas AAA necesarios para su actividad catalítica, así como la región N-terminal involucrada en el reconocimiento de las proteínas Pup. Además de la ausencia de dos segmentos de aminoácidos en el dominio C-terminal, que están directamente relacionados con la ausencia de proteosoma 20S.

La proteína Pup mantiene características estructurales similares a la proteína Pup de *M. tuberculosis*, siguiendo un patrón de desorden. Lo que favorece su reconocimiento e interacción con otras proteínas. Además presenta el motivo GGE necesario para su ligación a los sustratos.

Las secuencias en aminoácidos de las proteínas homólogas Dop y PafA en *B. longum*, mantienen una estructura secundaria semejante a las proteínas reportadas en *A. cellulolyticus* y *C. glutamicum*. Fue posible identificar los sitios clave de reconocimiento y actividad en ambas proteínas; así como su estructura tridimensional basada en modelos por homología. Esta relación tan estrecha en estructuras puede predecir la funcionalidad de las proteínas, los resultados indican la participación de estas enzimas como depupilasa y ligasa en *B. longum*.

Se identificaron proteínas candidatas a pupilación en *B. longum*. Los mayores porcentajes de proteínas candidatas, reflejan proteínas involucradas en

metabolismo y pared celular. Algunas de estas proteínas coordinan sistemas multienzimáticos necesarios para la generación de energía, otras participan en la integridad estructural de la célula; por tanto deben mantenerse bajo un estricto control de calidad.

Se ha reportado la presencia de chaperonas (ClpC y ClpX) y proteasas (ClpP, Lon y FtsH) en *B. longum*; con esta evidencia nuestra propuesta de que este mecanismo de pupilación puede estar implicado en la degradación de proteínas en conjunto con estas proteasas, que en complejo con BI-ARC conducirán la degradación de proteínas. Aunque no descartamos que este mecanismo puede estar involucrado solo en el plegamiento de proteínas.

Proponemos el siguiente mecanismo para *B. longum*:

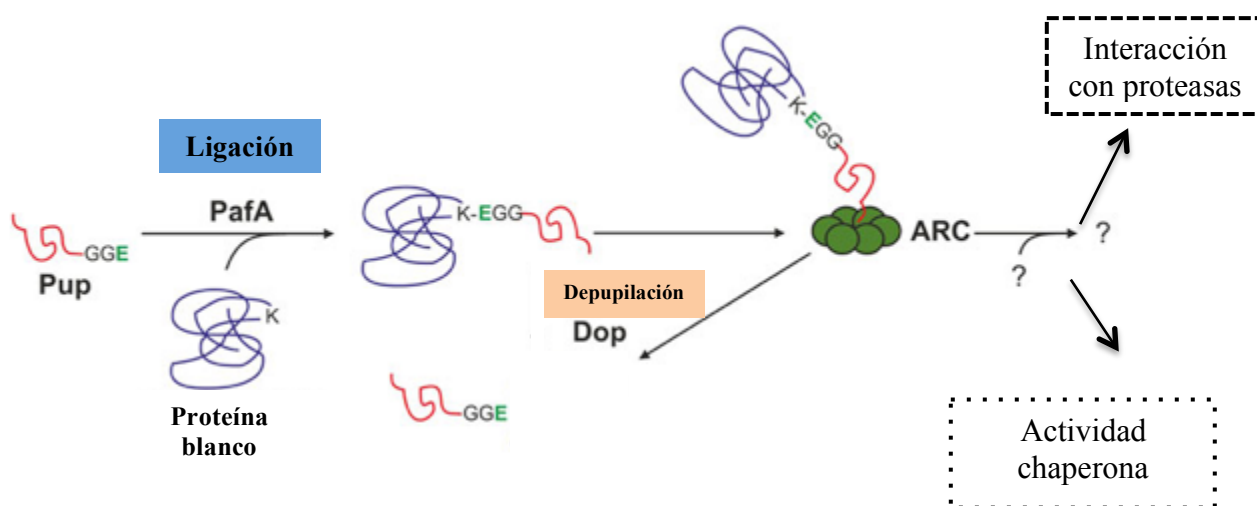


Figura 29. Esquema de pupilación propuesto para *B. longum* modificado de Barandun *et al.*, 2002. Los sustratos serían etiquetados con Pup, con la intervención de PafA como ligasa. Luego estos sustratos marcados serían reconocidos por ARC, para ser desplegados y enviados a degradación ó para ayudar a su plegamiento. Dop participaría reciclando las proteínas Pup, depupilando los sustratos.

La descripción de este sistema de etiquetado de proteínas en bacterias es algo novedoso que puede conducir al entendimiento de los mecanismos hasta ahora desconocidos en *B. longum* subsp. *infantis*.

5. Referencias

- Akatsu, H., Iwabuchi, N., Xiao, J. Z., Matsuyama, Z., Kurihara, R., Okuda, K., Yamamoto, T. and Maruyama, M. (2013) 'Clinical effects of probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 on immune function and intestinal microbiota in elderly patients receiving enteral tube feeding', *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 37(5), 631-40.
- Allen, S. J., Wareham, K., Wang, D., Bradley, C., Hutchings, H., Harris, W., Dhar, A., Brown, H., Foden, A., Gravenor, M. B. and Mack, D. (2013) 'Lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in older inpatients (PLACIDE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial', *Lancet*, 382(9900), 1249-57.
- Bar-Nun, S. and Glickman, M. H. (2012) 'Proteasomal AAA-ATPases: structure and function', *Biochimica et biophysica acta*, 1823(1), 67-82.
- Barandun, J., Delley, C. L. and Weber-Ban, E. (2012) 'The pupylation pathway and its role in mycobacteria', *BMC biology*, 10, 95.
- Beyer, A. (1997) 'Sequence analysis of the AAA protein family', *Protein Sci*, 6(10), 2043-58.
- Borsook, H. and Keighley, G. (1934) 'A Theory of Protein Metabolism in Man', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20(3), 179-83.
- Brenner, D. M. and Chey, W. D. (2009) '*Bifidobacterium infantis* 35624: a novel probiotic for the treatment of irritable bowel syndrome', *Reviews in gastroenterological disorders*, 9(1), 7-15.
- Briskin, D. P. and Poole, R. J. (1983) 'Role of magnesium in the plasma membrane ATPase of red beet', *Plant physiology*, 71(4), 969-71.
- Burns, K. E. and Darwin, K. H. (2012) 'Pupylation: proteasomal targeting by a protein modifier in bacteria', *Methods in molecular biology*, 832, 151-60.
- Burns, K. E., Cerda-Maira, F. A., Wang, T., Li, H., Bishai, W. R. and Darwin, K. H. (2010) '"Depupylation" of prokaryotic ubiquitin-like protein from mycobacterial proteasome substrates', *Molecular cell*, 39(5), 821-7.

-
- Camus, J. C., Pryor, M. J., Medigue, C. and Cole, S. T. (2002) 'Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv', *Microbiology*, 148(Pt 10), 2967-73.
- Chen, K., Kurgan, L. A. and Ruan, J. (2007) 'Prediction of flexible/rigid regions from protein sequences using k-spaced amino acid pairs', *BMC structural biology*, 7, 25.
- Chen, X., Solomon, W. C., Kang, Y., Cerda-Maira, F., Darwin, K. H. and Walters, K. J. (2009) 'Prokaryotic Ubiquitin-Like Protein Pup Is Intrinsically Disordered', *Journal of Molecular Biology*, 392(1), 208-217.
- Chen, Z., Chen, Y. Z., Wang, X. F., Wang, C., Yan, R. X. and Zhang, Z. (2011) 'Prediction of ubiquitination sites by using the composition of k-spaced amino acid pairs', *PloS one*, 6(7), e22930.
- Darwin, K. H., Ehrh, S., Gutierrez-Ramos, J. C., Weich, N. and Nathan, C. F. (2003) 'The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide', *Science*, 302(5652), 1963-6.
- Darwin, K. H., Lin, G., Chen, Z., Li, H. and Nathan, C. F. (2005) 'Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase homologue', *Molecular microbiology*, 55(2), 561-71.
- de Vrese, M., Rautenberg, P., Laue, C., Koopmans, M., Herremans, T. and Schrezenmeir, J. (2005) 'Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination', *European journal of nutrition*, 44(7), 406-13.
- Djuranovic, S., Hartmann, M. D., Habeck, M., Ursinus, A., Zwickl, P., Martin, J., Lupas, A. N. and Zeth, K. (2009) 'Structure and activity of the N-terminal substrate recognition domains in proteasomal ATPases', *Molecular cell*, 34(5), 580-90.
- Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M. and Rotstein, S. H. (2000) 'Structure-function relationships of glutamine synthetases', *Biochimica et biophysica acta*, 1477(1-2), 122-45.
- Erbse, A., Schmidt, R., Bornemann, T., Schneider-Mergener, J., Mogk, A., Zahn, R., Dougan, D. A. and Bukau, B. (2006) 'ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli*', *Nature*, 439(7077), 753-6.
- Frees, D., Chastanet, A., Qazi, S., Sorensen, K., Hill, P., Msadek, T. and Ingmer, H. (2004) 'Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular

replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*', *Molecular microbiology*, 54(5), 1445-62.

- Flynn, J. M., Neher, S. B., Kim, Y. I., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2003) 'Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals', *Molecular cell*, 11(3), 671-83.
- Frickey, T. and Lupas, A. (2004) 'CLANS: a Java application for visualizing protein families based on pairwise similarity', *Bioinformatics*, 20(18), 3702-4.
- Gill, H. S. and Eisenberg, D. (2001) 'The crystal structure of phosphinothricin in the active site of glutamine synthetase illuminates the mechanism of enzymatic inhibition', *Biochemistry*, 40(7), 1903-12.
- Groeger, D., O'Mahony, L., Murphy, E. F., Bourke, J. F., Dinan, T. G., Kiely, B., Shanahan, F. and Quigley, E. M. (2013) '*Bifidobacterium infantis* 35624 modulates host inflammatory processes beyond the gut', *Gut microbes*, 4(4), 325-39.
- Gur, E. and Sauer, R. T. (2008) 'Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA(+) protease', *Genes & development*, 22(16), 2267-77.
- Guth, E., Thommen, M. and Weber-Ban, E. (2011) 'Mycobacterial ubiquitin-like protein ligase PafA follows a two-step reaction pathway with a phosphorylated pup intermediate', *The Journal of biological chemistry*, 286(6), 4412-9.
- Guzman, M. (2011) Análisis estructural y funcional de la proteína BI-ARC perteneciente a la familia de ATPasas AAA de *Bifidobacterium longum*, tesis maestría IPICYT.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis in't Veld, J. H. (1998) 'Overview of gut flora and probiotics', *International journal of food microbiology*, 41(2), 85-101.
- Hoskins, J. R., Pak, M., Maurizi, M. R. and Wickner, S. (1998) 'The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpAP', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12135-40.
- Hosseini, A., Nikfar, S. and Abdollahi, M. (2012) 'Probiotics use to treat irritable bowel syndrome', *Expert opinion on biological therapy*, 12(10), 1323-34.

-
- Inobe, T. and Matouschek, A. (2008) 'Protein targeting to ATP-dependent proteases', *Current opinion in structural biology*, 18(1), 43-51.
- Iyer, L. M., Burroughs, A. M. and Aravind, L. (2008) 'Unraveling the biochemistry and provenance of pupylation: a prokaryotic analog of ubiquitination', *Biology direct*, 3, 45.
- Jennings, L. D., Lun, D. S., Medard, M. and Licht, S. (2008) 'ClpP hydrolyzes a protein substrate processively in the absence of the ClpA ATPase: mechanistic studies of ATP-independent proteolysis', *Biochemistry*, 47(44), 11536-46.
- Joint FAO/WHO Working Group. (2002). 'Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food', London, ON: FAO/WHO.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. and Price, N. C. (2005) 'How to study proteins by circular dichroism', *Biochimica et biophysica acta*, 1751(2), 119-39.
- Klijn, A., Moine, D., Delley, M., Mercenier, A., Arigoni, F. and Pridmore, R. D. (2006) 'Construction of a reporter vector for the analysis of *Bifidobacterium longum* promoters', *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 7401-5.
- Kuhbacher, T., Ott, S. J., Helwig, U., Mimura, T., Rizzello, F., Kleessen, B., Gionchetti, P., Blaut, M., Campieri, M., Folsch, U. R., Kamm, M. A. and Schreiber, S. (2006) 'Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis', *Gut*, 55(6), 833-41.
- Langklotz, S., Baumann, U. and Narberhaus, F. (2012) 'Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH', *Biochimica et biophysica acta*, 1823(1), 40-8.
- Levchenko, I., Seidel, M., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2000) 'A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machine', *Science*, 289(5488), 2354-6.
- Liao, S. H., Shang, Q., Zhang, X. C., Zhang, J. H., Xu, C. and Tu, X. M. (2009) 'Pup, a prokaryotic ubiquitin-like protein, is an intrinsically disordered protein', *Biochemical Journal*, 422, 207-215.
- Luckey, T. D. (1972) 'Introduction to intestinal microecology', *The American journal of clinical nutrition*, 25(12), 1292-4.

-
- Martin, A., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2005) 'Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines', *Nature*, 437(7062), 1115-20.
- Maupin-Furlow, J. (2012) 'Proteasomes and protein conjugation across domains of life', *Nature reviews. Microbiology*, 10(2), 100-11.
- McIntosh, G. H. (1996) 'Probiotics and colon cancer prevention', *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 5(1), 48-52.
- Melchior, F. (2000) 'SUMO--nonclassical ubiquitin', *Annual review of cell and developmental biology*, 16, 591-626.
- Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Huang, C. C. and Ferrin, T. E. (2006) 'Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera', *BMC bioinformatics*, 7, 339.
- Ogura, T. and Wilkinson, A. J. (2001) 'AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function', *Genes Cells*, 6(7), 575-97.
- Ozcelik, D., Barandun, J., Schmitz, N., Sutter, M., Guth, E., Damberger, F. F., Allain, F. H., Ban, N. and Weber-Ban, E. (2012) 'Structures of Pup ligase PafA and depupylase Dop from the prokaryotic ubiquitin-like modification pathway', *Nature communications*, 3, 1014.
- Pearce, M. J., Mintseris, J., Ferreyra, J., Gygi, S. P. and Darwin, K. H. (2008) 'Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*', *Science*, 322(5904), 1104-7.
- Phizicky, E. M. and Fields, S. (1995) 'Protein-protein interactions: methods for detection and analysis', *Microbiological reviews*, 59(1), 94-123.
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F. and Matuchansky, C. (2005) 'Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits', *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 22(6), 495-512.
- Poulsen, C., Akhter, Y., Jeon, A. H. W., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H. E., Stefanski, A., Stuhler, K., Wilmanns, M. and Song, Y. H. (2010) 'Proteome-wide identification of mycobacterial pupylation targets', *Molecular Systems Biology*, 6.
- Reddy, B. S. (1998) 'Prevention of colon cancer by pre- and probiotics: evidence from laboratory studies', *The British journal of nutrition*, 80(4), S219-23.

-
- Ringel-Kulka, T., Palsson, O. S., Maier, D., Carroll, I., Galanko, J. A., Leyer, G. and Ringel, Y. (2011) 'Probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* Bi-07 versus placebo for the symptoms of bloating in patients with functional bowel disorders: a double-blind study', *Journal of clinical gastroenterology*, 45(6), 518-25.
- Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y. (2010) 'I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction', *Nature protocols*, 5(4), 725-38.
- Roy, A., Yang, J. and Zhang, Y. (2012) 'COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation', *Nucleic acids research*, 40(Web Server issue), W471-7.
- Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2011) 'AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction', *Annual review of biochemistry*, 80, 587-612.
- Schlieker, C., Weibezahn, J., Patzelt, H., Tessarz, P., Strub, C., Zeth, K., Erbse, A., Schneider-Mergener, J., Chin, J. W., Schultz, P. G., Bukau, B. and Mogk, A. (2004) 'Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB', *Nature structural & molecular biology*, 11(7), 607-15.
- Schoenheimer, R. R., S. and Rittenberg, D. (1939) 'Studies in protein metabolism', *J. Biol Chem*, 127, 333-344.
- Singh, A., Hacini-Rachinel, F., Gosoniu, M. L., Bourdeau, T., Holvoet, S., Doucet-Ladeveze, R., Beaumont, M., Mercenier, A. and Nutten, S. (2013) 'Immune-modulatory effect of probiotic *Bifidobacterium lactis* NCC2818 in individuals suffering from seasonal allergic rhinitis to grass pollen: an exploratory, randomized, placebo-controlled clinical trial', *European journal of clinical nutrition*, 67(2), 161-7.
- Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N. and Reddy, B. S. (1997) '*Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis', *Carcinogenesis*, 18(4), 833-41.
- Singh, S. K., Guo, F. and Maurizi, M. R. (1999) 'ClpA and ClpP remain associated during multiple rounds of ATP-dependent protein degradation by ClpAP protease', *Biochemistry*, 38(45), 14906-15.
- Smith, D. M., Kafri, G., Cheng, Y., Ng, D., Walz, T. and Goldberg, A. L. (2005) 'ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins', *Molecular cell*, 20(5), 687-98.

-
- Smith, D. M., Fraga, H., Reis, C., Kafri, G. and Goldberg, A. L. (2011) 'ATP binds to proteasomal ATPases in pairs with distinct functional effects, implying an ordered reaction cycle', *Cell*, 144(4), 526-38.
- Snider, J. and Houry, W. A. (2008) 'AAA+ proteins: diversity in function, similarity in structure', *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 1), 72-7.
- Stackebrandt Erko, R. F. A. a. W.-r. N. L. (1997) 'Proposal for New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov.', *International journal of systematic bacteriology*, 47(2), 479-491.
- Stothard, P. (2000) 'The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences.', *Biotechniques*, 28, 1102-1104.
- Striebel, F., Hunkeler, M., Summer, H. and Weber-Ban, E. (2010) 'The mycobacterial Mpa-proteasome unfolds and degrades pupylated substrates by engaging Pup's N-terminus', *The EMBO journal*, 29(7), 1262-71.
- Striebel, F., Imkamp, F., Sutter, M., Steiner, M., Mamedov, A. and Weber-Ban, E. (2009) 'Bacterial ubiquitin-like modifier Pup is deamidated and conjugated to substrates by distinct but homologous enzymes', *Nature structural & molecular biology*, 16(6), 647-51.
- Sutter, M., Striebel, F., Damberger, F. F., Allain, F. H. and Weber-Ban, E. (2009) 'A distinct structural region of the prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) is recognized by the N-terminal domain of the proteasomal ATPase Mpa', *FEBS letters*, 583(19), 3151-7.
- Swaffield, J. C. and Purugganan, M. D. (1997) 'The evolution of the conserved ATPase domain (CAD): reconstructing the history of an ancient protein module', *Journal of molecular evolution*, 45(5), 549-63.
- Thomson, R. and Esnouf, R.M. (2004). Prediction of natively disordered regions in proteins using a bio-basis function neural network., *Lecture Notes in Computer Science*, 3177/2004, 108-116
- Thomson, R., Hodgman, T. C., Yang, Z. R. and Doyle, A. K. (2003) 'Characterizing proteolytic cleavage site activity using bio-basis function neural networks', *Bioinformatics*, 19(14), 1741-7.
- Tissier H (1900) 'Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourisson', *These de Paris*:1-253.

-
- Tomko, R. J., Jr. and Hochstrasser, M. (2011) 'Order of the proteasomal ATPases and eukaryotic proteasome assembly', *Cell biochemistry and biophysics*, 60(1-2), 13-20.
- Trushina, E. N., Mustafina, O. K., Nikitiuk, D. B., Podbel'tsev, D., Mozgovaia, I. N. and Vustina, T. F. (2006) '[The immune-enhancing effects of oral administration of strains bifidobacteria in experiments]', *Voprosy pitaniia*, 75(5), 70-4.
- Tung, C. W. (2013) 'Prediction of pupylation sites using the composition of k-spaced amino acid pairs', *Journal of theoretical biology*, 336, 11-7.
- Valas, R. E. and Bourne, P. E. (2008) 'Rethinking proteasome evolution: two novel bacterial proteasomes', *Journal of molecular evolution*, 66(5), 494-504.
- Vale, R. D. (2000) 'AAA proteins. Lords of the ring', *The Journal of cell biology*, 150(1), F13-9.
- Van Melderren, L. and Aertsen, A. (2009) 'Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis', *Research in microbiology*, 160(9), 645-51.
- Varshavsky, A. (1996) 'The N-end rule: functions, mysteries, uses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), 12142-9.
- Ventura, M., O'Flaherty, S., Claesson, M. J., Turrone, F., Klaenhammer, T. R., van Sinderen, D. and O'Toole, P. W. (2009) 'Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics', *Nature reviews. Microbiology*, 7(1), 61-71.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J. (1982) 'Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold', *The EMBO journal*, 1(8), 945-51.
- Wang, T., Darwin, K. H. and Li, H. (2010) 'Binding-induced folding of prokaryotic ubiquitin-like protein on the Mycobacterium proteasomal ATPase targets substrates for degradation', *Nature structural & molecular biology*, 17(11), 1352-7.
- Wang, T., Li, H., Lin, G., Tang, C., Li, D., Nathan, C. and Darwin, K. H. (2009) 'Structural insights on the *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase Mpa', *Structure*, 17(10), 1377-85.

-
- Wickner, S., Maurizi, M. R. and Gottesman, S. (1999) 'Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins', *Science*, 286(5446), 1888-93.
- Wolf, S., Nagy, I., Lupas, A., Pfeifer, G., Cejka, Z., Muller, S. A., Engel, A., De Mot, R. and Baumeister, W. (1998) 'Characterization of ARC, a divergent member of the AAA ATPase family from *Rhodococcus erythropolis*', *J Mol Biol*, 277(1), 13-25.
- Yang, Z. R., Thomson, R., McNeil, P. and Esnouf, R. M. (2005) 'RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins', *Bioinformatics*, 21(16), 3369-76.
- You, J. and Yaqoob, P. (2012) 'Evidence of immunomodulatory effects of a novel probiotic, *Bifidobacterium longum* bv. infantis CCUG 52486', *FEMS immunology and medical microbiology*, 66(3), 353-62.
- Yu, Y., Smith, D. M., Kim, H. M., Rodriguez, V., Goldberg, A. L. and Cheng, Y. (2010) 'Interactions of PAN's C-termini with archaeal 20S proteasome and implications for the eukaryotic proteasome-ATPase interactions', *The EMBO journal*, 29(3), 692-702.
- Zhang, X., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H., van Heel, M. and Freemont, P. S. (2000) 'Structure of the AAA ATPase p97', *Molecular cell*, 6(6), 1473-84.
- Zhang, X., Stoffels, K., Wurzbacher, S., Schoofs, G., Pfeifer, G., Banerjee, T., Parret, A. H., Baumeister, W., De Mot, R. and Zwickl, P. (2004) 'The N-terminal coiled coil of the *Rhodococcus erythropolis* ARC AAA ATPase is neither necessary for oligomerization nor nucleotide hydrolysis', *Journal of structural biology*, 146(1-2), 155-65.
- Zhang, Y. (2008) 'I-TASSER server for protein 3D structure prediction', *BMC bioinformatics*, 9, 40.
- Zhao, X., Zhang, W., Xu, X., Ma, Z. and Yin, M. (2012) 'Prediction of protein phosphorylation sites by using the composition of k-spaced amino acid pairs', *PloS one*, 7(10), e46302.
- Zwickl, P., Ng, D., Woo, K. M., Klenk, H. P. and Goldberg, A. L. (1999) 'An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes', *The Journal of biological chemistry*, 274(37), 26008-14.

ANEXOS

Anexo I. Protocolo purificación banda de ADN del gel de agarosa (Kit QIAgen)

1. Cortar el fragmento de ADN del gel de agarosa.
2. Pesar el fragmento de agarosa en un tubo Eppendorf. Añadir 3 volúmenes de buffer QG por cada volumen de gel.
3. Incubar a 50 °C por 10 min hasta que el gel se haya disuelto.
4. Adicionar un volumen de isopropanol a la mezcla.
5. Colocar la columna QIAgen con su tubo colector.
6. Adicionar la mezcla a la columna QIAgen, centrifugar 1 min a 13,000 rpm.
7. Desechar el sobrenadante y coloque la columna de nuevo en el tubo colector.
8. Adicionar 0.5 ml de buffer QG a la columna QIAgen y centrifugar 1 min.
9. Adicionar 0.75 ml de buffer PE a la columna QIAgen, centrifugar 1 min y desechar el sobrenadante del tubo colector. Repetir una vez este paso.
10. Realizar una centrifugada adicional de 1 min para eliminar los restos de etanol.
11. Colocar la columna QIAquick en un tubo limpio de 1.5 ml para eluir el ADN, añadir 50 µl de buffer EB.

Anexo II. Protocolo limpieza de producto de PCR (Kit-QIAgen)

1. Adicionar un volumen igual al volumen del producto de PCR de "membrane binding solution".
2. Colocar la columna en un tubo colector de 2 ml, utilizar una columna para cada reacción de PCR.
3. Transferir el producto preparado de producto de PCR a la columna, e incubar por 1 min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar por un min a 13,000 rpm. Remover la columna y descartar el líquido filtrado, regresar la columna al tubo colector.
5. Lavar la columna con 700 µl de la "membrane wash solution", previamente diluida con etanol al 95%. Centrifugar durante 1 min a 13000 rpm, descartar el líquido filtrado. Repetir el lavado con 500 µl de la solución y centrifugar durante 5 min a 13,000 rpm.
6. Remover la columna del tubo colector, con cuidado de que no toque el líquido filtrado, descartar el líquido y volver a ensamblar, centrifugar durante 1 min a 13,000 rpm, para eliminar el resto de etanol.
7. Con cuidado transferir la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml limpio.
8. Adicionar 50 µl de agua libre de nucleasas directamente al centro de la membrana sin que la punta de la pipeta toque la membrana, Incubar a temperatura ambiente por 1 min. Centrifugar por 1 min a 13000 rpm.
9. Descartar la columna y utilizar el ADN o almacenar a -20°C.

Anexo III. Células competentes

1. Inocular un tubo que contiene 2 ml de LB con una colonia de *E. coli*. Incubar toda la noche a 37°C con agitación.
2. Transferir 200 μ l del cultivo inoculado en un inicio a un matraz e 250 ml que contenga 15 ml de medio LB. Se incuba a 37 °C durante 2 h para alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.4 a 0.6 que representan aproximadamente 5×10^7 células/ml.
3. Enfriar el cultivo por 10 min en hielo, así como el tubo para la centrifugación del cultivo celular.
4. Centrifugar 5 min a máxima velocidad a 4 °C, descartar el sobrenadante.
5. Resuspender las células suavemente (No usar vórtex) en la mitad del volumen original con una solución de CaCl_2 - 100mM/Tris- HCl 10mM, pH 8.0.
6. Incubar la suspensión celular en hielo durante 15 min.
7. Centrifugar 5 min a 4°C (7,500 rpm).
8. Resuspender en 1/15 del volumen original de la solución CaCl_2 – 100mM/Tris-HCl 10mM, pH 8.0.
9. Las células competentes pueden ser almacenadas en lotes de 200 μ l con un volumen igual de glicerol estéril (25% en la solución final).
10. Almacenar a -80 °C.

Anexo IV. Protocolo transformación

1. Descongelar el vial de las células competentes.
2. Anadir el ADN plasmídico y dejar reposar 30 min.
3. Dar un choque térmico a 42 °C por dos min.
4. Anadir 1 ml de medio LB estéril e incubar a 37 °C por un lapso de 1 h con agitación.
5. Plaquear la suspensión celular en medio LB con el antibiótico de selección.

Anexo V. Extracción de ADN plasmídico (Kit QIAgen)

1. Crecer un preinóculo de las colonias seleccionadas en 4 ml de medio LB a 37°C durante toda la noche.
2. Recuperar las células por centrifugación.
3. Resuspender la pastilla en 250 µl de buffer P1.
4. Adicionar 200 µl de buffer P2 y mezclar por inversión.
5. Adicionar 350 µl de buffer N3 y mezclar por inversión.
6. Centrifugar por 10 min a 13 000 rpm a 4°C
7. Poner el sobrenadante en una columna.
8. Centrifugar por 1 min a 13,000 rpm.
9. Unir el DNA a la membrana con 500 µl de buffer PB y centrifugar por 1 min a 13,000 rpm.
10. Lavar la columna con 750 µl de buffer PE y centrifugar por 1 min.
11. Descartar el líquido filtrado y centrifugar por 1 min adicional para desechar el etanol residual.
12. Eluir en un tubo limpio con 50 µl de buffer EB o agua destilada estéril.

Tubos (Duplicado)	ddH₂O - µl	BSA 2 µg/ µl
0	1000	0
1	999.5	0.5
4	998	2
8	996	4
12	994	6
16	992	8
20	990	10
24	988	12
28	986	14
32	984	16
40	980	20

Anexo VI. Gel de agarosa al 1%

Agarosa	0.4%
---------	------

Buffer TAE 1X	40 ml
---------------	-------

TAE 10X (1L)

Tris	48.4 g
------	--------

Acido acético	11.42 ml
---------------	----------

EDTA	7.44 g
------	--------

Agua destilada	c.b.p
----------------	-------

Anexo VII. Cuantificación de Proteína por el método de Bradford

Curva estándar

1. Medición a 595 nm.
2. Etiquetar los tubos.
3. Adicionar el agua destilada a cada uno de los tubos.
4. Adicionar el BSA.
5. Adicionar 300 μ l del colorante concentrado (Bio-Rad Protein) a cada uno de los tubos en el orden en que serán leídos, agitar.
6. Colocar las cubetas en el espectro para realizar las lecturas.
(Recomendable iniciar las lecturas con los tubos de menor concentración).
7. Lavar las cubetas con etanol y agua.
8. Calcular los promedios de las absorbancias.
9. Construir una curva que nos indique la concentración de proteína por el eje de las X y la absorbancia por el eje de las Y.

Anexo VIII. Electroforesis de proteínas

SDS-PAGE

Buffer 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (100 ml)

Tris base	18.15 g
Agua destilada	c.b.p.
*Ajustar el pH con HCl	

Buffer 0.5M Tris-HCl pH 6.8 (100 ml)

Tris base	6.0 g
Agua destilada	c.b.p.
*Ajustar pH con HCl	

SDS 10% (10 ml)

SDS	1 g
Agua destilada	c.b.p.

PSA 10% (1 ml)

Persulfato de amonio	0.1 g
Agua destilada	c.b.p.

Buffer de corrida 40X (400 ml)

Tris base	48.0 g
Glicina	30.0 g
SDS 10%	160.0 ml
Agua destilada	c.b.p.

Azul de Comassie (50 ml)

Azul de Comassie	0.125 g
Metanol	22.50 ml
Acido acético	22.50 ml
Agua destilada	c.b.p.

Solución de desteñido (500 ml)

Acido acético	25 ml
Metanol	250 ml
Agua destilada	c.b.p.

Buffer de carga (Laemmli 10 ml)

Tris 1M pH 8.8	2.5 ml
Glicerol	2.8 ml
Azul de bromofenol	25.0 mg
SDS 2%	2.0 ml
Agua destilada	c.b.p.

Gel de acrilamida gradiente 5.5 al 4%

Agua destilada	1.65 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	690 μ l
Acrilamida bis-acrilamida	365 μ l
SDS 10%	27.5 μ l
PSA	9.2 μ l
TEMED	0.91 μ l

Gel de acrilamida gradiente 5.5 al 20%

Agua destilada	205 μ l
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	690 μ l
Acrilamida bis-acrilamida	1.815 μ l
SDS 10%	27.5 μ l
PSA	9.2 μ l
TEMED	1.83 μ l

Gel de acrilamida separador al 10 %

Agua destilada	4.8 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	3.0 ml
Acrilamida bis-acrilamida	4.0 ml
SDS 10%	120.0 μ l
APS	60.0 μ l
TEMED	12.0 μ l

Gel de acrilamida concentrador al 4%

Agua destilada	1.9 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.5ml
Acrilamida bis-acrilamida	300 μ l
SDS 10%	30.0 μ l
APS	15.0 μ l
TEMED	1.5 μ l

Gel de acrilamida Nativo separador al 10%

Agua destilada	1.89 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.0 ml
Acrilamida bis-acrilamida	1.28 ml
SDS 10%	40.0 μ l
PSA	40.0 μ l
TEMED	2.40 μ l

Gel de acrilamida Nativo concentrador al 4%

Agua destilada	600 μ l
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	252 μ l
Acrilamida bis-acrilamida	132 μ l
SDS 10%	10.0 μ l
PSA	10.0 μ l
TEMED	1.0 μ l

Anexo IX. Western Blot

Buffer Transferencia Towbin (1L)

Tris-base 48 mM	5.8 g
Glicina 39 mM	2.9 g
Metanol 20%	200 ml
SDS 0.037% (SDS 10%)	3.7 ml

Rojo de Ponceau (10 ml)

Ponceau xilidina	0.05 g
Ácido acético glacial	500 μ l
Agua grado MQ	c.b.p.

PBS 20X pH 7.5 (500 ml)

NaCl	81.81 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3.86 g
Na ₂ H PO ₄	10.22 g
Agua Milli Q	c.b.p.

Solución de bloqueo (30 ml)

Leche Svelty 5%	1.25 g
PBS 1X	30 ml

Solución de lavado 30 ml

PBS 1X	30 ml
--------	-------

Solución anticuerpo primario 1:1000 (30 ml)

PBS 1X	30 ml
BSA 1%	0.3 g
Anticuerpo (Anti-ADH)	30 μ l

Solución Anticuerpo secundario 1:10,000 (20 ml)

PBS 1X	20 ml
BSA 1%	0.2 g
Anticuerpo	2 μ l

Buffer AP 100 ml

Tris-base	1.21 g
NaCl	0.58 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1.51 g
Agua MQ	c.b.p.

Solución de revelado 15 ml

Buffer AP	15 ml
NBT 50 mg/ml	66 µl
BCIP 50 mg/ml	33 µl

Protocolo

1. Cargar 50 µg de proteína en un gel de 12.5% de poliacrilamida desnaturalizante, por duplicado. Realizar la electroforesis a 110V y teñirlo con Comassie.

Transferencia.

- Humedecer la membrana de nitrocelulosa y papel filtro con buffer Towbin.
 - Equilibrar el gel por 15 min en buffer Towbin.
 - Colocar el papel filtro humedecido en la placa (ánodo) de la cámara de transferencia, evitar la formación de burbujas.
 - Colocar la membrana sobre el papel filtro.
 - Encima colocar el gel, eliminar las burbujas que se formen.
 - Colocar encima papel filtro humedecido.
 - Colocar la tapa del cátodo, cerrar y conectar.
 - Correr por 30 min a 10 volts.
2. Teñir con rojo de Ponceau, para visualizar la transferencia de las proteínas y el marcador de peso molecular (marcar y cortar).
 3. Lavar la membrana hasta eliminar todo el colorante.
 4. Lavar la membrana con PBS 1X.

-
5. Incubar la membrana con solución de bloqueo por toda la noche a temperatura ambiente en agitación constante.
 6. Lavar la membrana con PBS 1X, por 2 veces durante 5 min cada vez.
 7. Incubar la membrana con la solución del anticuerpo primario a 4°C en agitación constante.
 8. Lavar la membrana por 4-5 veces durante 5 min cada vez con solución de lavado.
 9. Incubar la membrana con la solución del anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante.
 10. Lavar la membrana con solución de lavado por 4-5 veces durante 5 min por vez.
 11. Revelar la reacción con la solución de revelado. El desarrollo de la reacción puede llevar de 5-20 min.
 12. Detener la reacción con agua destilada y dejar secar la membrana.

Anexo X. Purificación de proteína por columnas de afinidad (Ni-NTA)

Crecimiento de cultivos celulares.

1. Inocular 10 ml de LB con kanamicina con un stock de bacterias de un cultivo fresco. Incubar a 3°C una noche.
2. Inocular 30 ml de LB con 500 μ l de cultivo de una noche e incubarlo a 37 °C en agitación hasta alcanzar una OD de 0.6.
3. Adicionar IPTG 1mM y poner el inóculo a incubar 37°C con agitación durante 4 h.
4. Recuperar las células por centrifugación 15 min, almacenarlas a -20°C o procesarlas inmediatamente para purificación de proteínas por el método de condiciones nativas o desnaturalizantes.

Condiciones nativas

1. Cosechar las células del cultivo de la expresión por centrifugación.
2. Resuspender 5 ml de cultivo celular en 630 μ l de buffer de lisis.
3. Adicionar 20 mg/ml de lisozima e incubar en hielo por 30 min.
4. Sonicar la muestra sobre hielo. Dar pulsos de alta densidad en periodos de 10 s con pausas de 10 s entre cada pulso.
5. Centrifugar el lisado a 7,000 rpm por 15 min. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
6. Guardar 20 μ l de lisado para análisis en SDS-PAGE.
7. Equilibrar la columna Ni-NTA con 600 μ l de Buffer de lisis. Centrifugar 2 min a 2,900 rpm.
8. Cargar 600 μ l del lisado con la proteína marcada la etiqueta 6X de His en la columna pre-equilibrada. Centrifugar 5 min a 1,600 rpm.
9. Lavar la columna Ni-NTA 2 veces con 300 μ l de Buffer de lavado. Centrifugar 2 min a 2900 rpm.
10. Eluir la proteína 2 veces con 300 μ l de Buffer de Elución. Centrifugar 2 min a 2900 rpm y colectar el eluido.

Soluciones

Buffer de lisis.

$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM; pH 8.0.

Buffer de lavado.

$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM; pH 8.0.

Buffer de elución.

$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM; pH 8.0.

Condiciones desnaturalizantes.

1. Descongelar las células y resuspender en 700 μl de Buffer B-7M urea.
2. Incubar las células con agitación por 15 min a temperatura ambiente.
3. Centrifugar el lisado 12000xg durante 15-30 min a temperatura ambiente para que se sedimente la parte celular. Colectar el sobrenadante.
4. Guardar 20 μl de este lisado para observarlo en geles SDS-PAGE.
5. Cargar 600 μl del lisado (sobrenadante) que contiene la proteína marcada con la etiqueta 6x de His en la columna pre-equilibrada Ni-NTA. Centrifugar 5 min a 1,600 rpm y recolectar el sobrenadante de desecho.
6. Lavar la columna Ni-NTA con 600 μl de Buffer C. Centrifugar 2 min a 2,900 rpm (repetir 2 veces).
7. Eluir la proteína 2 veces con 200 μl de Buffer E. Centrifugar 2 min a 2,900 rpm y colectar la elución.

Soluciones

Buffer A*: Gu-HCl 6M; NaH_2PO_4 0.1M; Tris.HCl 0.01M; pH 8.0.

Buffer B-M Urea: urea 7M; NaH_2PO_4 0.1M; Tris-HCl 0.01M; pH 8.0.

Buffer C: Urea 8M; NaH_2PO_4 0.1M; Tris-Cl 0.01M; pH 6.3.

Buffer D*: Urea 8M; NaH_2PO_4 0.1M; Tris-Cl 0.01M; pH 5.9.

Buffer E: Urea 8M; NaH_2PO_4 0.1M; Tris-Cl 0.01M; pH 4.5.

*Buffer A y D no son necesarios en todas las proteínas.

Anexo XI. Ensayo enzimático con caseína como sustrato

Reactivos:

A) 50 mM buffer acetato de potasio pH 7.5 a 37°C

B) 0.65% (w/v) caseína

Para disolver calentar brevemente sin hervir y ajustar el pH a 37°C.

C) 110 mM ácido tricloroacético

Diluir 9 ml de ácido tricloroacético (6.1N) en 500 ml de agua destilada.

D) Fenol Folin & Ciocalteu's

Diluir 10 ml de Folin & Ciocalteu's en 40 ml de agua destilada.

E) 500 mM carbonato de sodio

F) 10 mM acetato de sodio con 5mM de acetato de calcio pH 7.5 a 37 °C

G) 1.1 mM L-tirosina como estándar

H) Solución con proteasa.

Pipetear las soluciones con la siguiente matriz (en mililitros):

	Blanco	Muestra
Reactivo B (Caseína)	5.0	5.0
Equilibrar a 37°C, enseguida adicionar:		
Reactivo H (Solución de proteasa)	1.0	----
Mezclar e incubar a 37°C por exactamente 10 min		
Reactivo C (Ac. Tricloroacético)	5.0	5.0
Reactivo H (Solución de proteasa)	----	1.0

Mezclar e incubar a 37°C por 30 min. Filtrar las mezclas (papel filtro whatman #50 ó 0.45 m). Usar este filtrado para continuar la prueba de revelado de color.

Curva estándar:

Pipetear los siguientes reactivos (en mililitros):

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Blanco
Reactivo G	0.05	0.10	0.20	0.40	0.0
Agua destilada	1.95	1.90	1.80	1.60	2.0
Reactivo E	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Reactivo D	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Para el revelado del color:

Muestra:

Pipetear los siguientes reactivos en tubos limpios (en mililitros):

	Muestra	Blanco
Muestra filtrada	2.0	----
Blanco filtrado	----	2.0
Reactivo E	5.0	5.0
Reactivo D	1.0	1.0

Mezclar e incubar por 30 min. Poner los tubos a temperatura ambiente y filtrarlos previamente antes de realizar la lectura a una absorbancia de 660 nm.

Anexo XII. Actividad ATPasa

Buffer de reacción (5 ml)

MES 50 mM pH 5.5 250 μ l

MgCl₂ 10 mM 50 μ l

L-Cisteína 2 mM 10 μ l

ATP 1 mM 5 μ l

Reactivo de color (5 ml)

Tritón 1-X 2% 2 μ l

Molibdato de amonio 4.2 % en HCl 4N 10 ml

Verde de malaquita 0.045 % 30 ml

1. Mezclar 3 volúmenes de la solución verde malaquita 0.045 % con un volumen de molibdato de amonio 4.2 % y mezclar con la barra magnética durante 30 min.
2. Filtrar la solución por Watman 0.45 μ m. Colocar la solución en una botella de vidrio pre-tratada con HCl 1N y protegerla de la luz.
3. Adicionar 2 μ l de Tritón 1-X 2 %
4. Guardar a 4°C (Estable por una semana).

Anexo XIII. Publicaciones

Biocatalysis and Biotransformation, 2014; 32: 295–301

informa
healthcare

Identification, heterologous expression and detection of enzymatic activity of an asparaginase from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*

MABEL GUZMÁN-RODRÍGUEZ, MARÍA GUADALUPE SERNA-DOMÍNGUEZ
& LETICIA SANTOS

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT), Mexico

Abstract

Asparaginases (ASNases) participate in the metabolism of all living organisms in the hydrolysis of free asparagines. Bacterial ASNases are used in cancer chemotherapy as they efficiently deplete amino acids. However, allergic reactions and silent inactivation represent critical limitations to their extended use. The rationale of this study was to identify, express, and characterize a plant-type L-ASNase from the archaeon *Thermoplasma acidophilum* as an enzyme with potentially improved characteristics. The *Ta0338* *orf* was cloned into the pET28a(+) expression vector and overexpressed as a soluble protein with a molecular weight of 32 kDa. The quantity of recombinant L-ASNase produced in *Escherichia coli* was estimated as 9.68 mg/l. The purified protein showed evident autocatalytic processing of the zymogen at 4° and 37°C at physiological pH of 7.2 and clearly generated the expected alpha and beta subunits of 18 and 13 kDa, respectively. We propose that Ta-ASNase represents a potential biotechnological product for therapeutic purposes.

Keywords: *Autocatalytic processing, acute lymphoblastic leukemia, plant-type L-asparaginase, thermoplasma acidophilum*

Abbreviations: *ASNase: asparaginase; ALL: acute lymphoblastic leukemia*

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:

<http://www.researchtrends.net/tia/abstract.asp?in=0&vn=9&tid=41&aid=5574&pub=2014&type=3>

ABSTRACT

Heterologous expression and biochemical characterization of iron superoxide dismutase from *Thermoplasma acidophilum*

Mabel Guzmán-Rodríguez, Joshua E. Esparza de Lara, Leticia Santos

Pages: 35 - 41

Number of pages: 7

Current Trends in Microbiology

Volume 9

Copyright © 2014 Research Trends. All rights reserved

ABSTRACT

Superoxide dismutases (SODs) from thermoacidophilic organisms have industrial relevance because of their unique biochemical properties in comparison to their bacterial homologues. In this study, the *Ta0013 orf* from the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum* genome was cloned, expressed and the recombinant protein characterized. The yield of purified recombinant *T. acidophilum* SOD (TaFeSOD) was 43.51 mg/l and identified as an iron-containing protein by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). Electrophoretic analysis resulted in a single band of 25 kDa and native form of the enzyme was confirmed as a homotetramer. The specific activity of the purified enzyme was 118.5 U/mg at 23 °C and active at a temperature range between 15-60 °C and pH range 2-10. We found 100% thermostability at 50 °C for 60 min. The enzyme was inactivated by 10 mM hydrogen peroxide after 15 min incubation at 25 °C and pH 7.8. Due to the characteristics presented here we propose TaFeSOD as a potential product for biotechnological applications as a reagent in the preparation of drugs, cosmetics, and/or biochemical substances.

[Buy this Article](#)

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:

<http://informahealthcare.com/doi/full/10.3109/10242422.2014.974572>

***Mycobacterium tuberculosis* TLR2 agonists LprA, LM and Man-LAM induce *notch1* and *socs3* transcription**

Erika Nahomy Marino-Marmolejo¹, Citlalli Tornez-Benítez², Vania Elvira Bonifaz-Peña³, Mabel Guzmán-Rodríguez³, Hugo Enrique López-González¹, Abel Gutiérrez-Ortega¹, Leticia Santos^{3*} and Mario Alberto Flores-Valdez^{1*}

¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C., Guadalajara, Jalisco, 44270 México.

²Laboratorio Estatal de Salud Pública de Guerrero "Galo Soberón y Parra", Acapulco, Guerrero, México, 39715.

³División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis Potosí, San Luis Potosí, 78216 México.

Accepted 20 July, 2011

Mycobacterium tuberculosis employs a number of strategies to subvert host signaling events, leading to its persistence within macrophages. Upon infection, *Mycobacterium bovis* BCG induce the expression of suppressor of cytokine signaling 3 (*socs3*), in a Toll-like receptor 2 (TLR2)-*Notch1*-dependent manner. Purified phosphatidyl inositol di-mannosides (a TLR2 agonist) act as an inducer for the *Notch1*-*socs3* pathway. This prompted us to analyze other TLR2 agonists seeking for additional molecules that may affect this pathway. We found that lipoprotein LprA, as well as glycolipids lipomannan (LM), and mannose-capped lipoarabinomannan (ManLAM) treatment of murine macrophages resulted in stimulation of *notch1* and *socs3* transcription.

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:

<http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/53A87EB11958>

Acta Biochimica Polonica

Characterization of ATPase activity of the AAA ARC from *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis*

Mabel Guzmán-Rodríguez, Ana Paulina Barba de la Rosa, and Leticia Santos*

ABSTRACT

Bifidobacteria are considered probiotics that exist in the large intestine and are helpful to maintaining human health. Oral administration of bifidobacteria may be effective for improving of intestinal flora and the intestinal environment, stimulating the immune response and possibly preventing cancer. However, for consistent and positive results, further well-controlled studies are urgently needed to describe the basic mechanisms of this microorganism. Analysis of the lacking-proteasome *Bifidobacterium longum* genome possesses a gene, *IPR003593 AAA ATPase core*, which codes a 56 kDa protein containing one AAA ATPase domain. Phylogenetic classification made by CLANS positioned this sequence into the ARC AAA divergent branch of the AAA ATPase family of proteins. N-terminal analysis of the sequence indicates this protein is closely related to ATPases such as the *Rhodococcus erythropolis* ARC, *Archaeoglobus fulgidus* PAN, *Mycobacterium tuberculosis* Mpa and the human proteasomal Rpt1 subunit. The gene was cloned; the full-length recombinant protein overexpressed in *E. coli*, purified it as a high-molecular size complex and termed it as BI-ARC. Enzymatic characterization showed that BI-ARC ATPase is active, Mg^{+2} -dependent and sensitive to *N*-ethylmaleimide. Gene organization positions *bl-arc* in a region flanked by a cluster of genes that includes *pup*, *dop* and *pafA* genes. These findings point to a possible function as a chaperone in the degradation pathway via pupylation.