



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

Clonación y caracterización funcional de la proteína ClpB
de distintos microorganismos residentes en la microbiota
humana.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Marquez Marco, Carmen

Tutor/a: García Gimeno, María Adelaida

Cotutor/a externo: BENITEZ PAEZ, AFONSO

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Resumen

La microbiota humana se define como el conjunto de microorganismos que habitan en nuestro cuerpo, de manera simbiótica, sin causar daño en él; principalmente, en lugares como la piel, la cavidad oral y el tracto gastrointestinal. Estos organismos, entre los que se incluyen bacterias, arqueas, hongos y virus forman un ecosistema complejo y dinámico que se encuentra en constante evolución, siendo completamente distinto en diferentes puntos vitales como la infancia o la vida adulta.

En particular, los microorganismos que componen nuestra microbiota intestinal realizan funciones esenciales implicadas en la salud humana, entre ellas destacan: su influencia en la digestión de alimentos, la producción de vitaminas, la protección contra patógenos o incluso su estrecha y recién conocida relación con el sistema nervioso. Sin embargo, esta intrincada situación de equilibrio puede romperse, y es entonces cuando pueden surgir una serie de problemas de salud. Factores como el consumo excesivo de alimentos ultra-procesados ricos en azúcares refinados y grasas saturadas, alteración de los ritmos circadianos, intolerancias alimentarias o enfermedades inmunitarias pueden causar un desequilibrio de la mal llamada flora intestinal. Esto puede conllevar a una reducción tanto en la diversidad como en la cantidad de microorganismos comensales, lo que puede derivar en patologías como la enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer, diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares, obesidad e incluso enfermedades mentales como la depresión.

La proteína caseinolítica proteasa B o ClpB, es una chaperona que se encuentra en las células de todo el organismo humano (y en muchas otras especies eucariotas y procariontes), siendo más abundante en el cerebro. Su función es la de desplegar las proteínas mal plegadas que pudieran formar aglomeraciones, y, alteraciones en esta proteína pueden desembocar en patologías metabólicas y/o intestinales. Diversos estudios, muestran que la microbiota intestinal también produce homólogos funcionales de esta proteína (por ejemplo, *Escherichia coli*) y que está implicada en la regulación de la saciedad, al poseer una pequeña región estructural similar a la hormona estimulante de melanocitos o α -MSH, lo cual la convierte en un potencial mimético de dicha función. De hecho, un estudio reciente expone que la bacteria *Hafnia alvei*, simbionte de tracto gastrointestinal, y en concreto su proteína ClpB, podría utilizarse como aproximación terapéutica para ayudar a los individuos obesos a adelgazar.

En el presente Trabajo de Fin de Máster (TFM) se ha planteado la clonación y sobre-expresión controlada de la proteína ClpB codificada en el genoma de la bacteria *Bacteroides uniformis* CECT 7771, una cepa con potencial probiótico capaz de reducir el aumento del peso corporal, así como los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos, glucosa y leptina en ratones obesos. La investigación realizada en el laboratorio *Host-Interactions in Metabolic Health* del Centro de investigación Príncipe Felipe (CIPF), donde se realizó el presente TFM, sugiere que dicho microorganismo es, además, capaz de modular la microbiota intestinal y las alteraciones inmunitarias asociadas a la obesidad de acuerdo con los últimos resultados de sus investigaciones.

Por consiguiente, el objetivo de este estudio es clonar y purificar la proteína ClpB presente en *Bacteroides uniformis*, y su contraparte codificada en el genoma de *E. coli* como control. Para ello, se utilizarán técnicas de biología molecular, bioquímicas y biotecnológicas con la finalidad última de indagar si el mecanismo por el cual esta bacteria modula positivamente la saciedad en el hospedador se debe a la presencia de ClpB, que mimetizaría la actividad de la α -MSH humana. De esta forma, se podrá en el futuro caracterizar y entender en profundidad dicho mecanismo molecular para validar el uso de esta cepa como una herramienta capaz de solventar el problema mundial que supone la obesidad.

Abstract

The human microbiota is defined as the set of microorganisms that inhabit our body in a symbiotic way, without causing harm to it, mainly in places such as the skin, oral cavity and gastrointestinal tract. These organisms, which include bacteria, archaea, fungi and viruses, form a complex and dynamic ecosystem that is in constant evolution, being completely different at different vital points such as infancy or adulthood.

In particular, the microorganisms that make up our intestinal microbiota perform essential functions involved in human health, among them: their influence on food digestion, vitamin production, protection against pathogens or even their close and recently known relationship with the nervous system. However, this intricate balance can be disrupted, and it is then that a number of health problems can arise. Factors such as excessive consumption of ultra-processed foods rich in refined sugars and saturated fats, circadian rhythm alteration, food intolerances or immune diseases can cause an imbalance of the poorly named intestinal flora. This can lead to a reduction in both the diversity and quantity of commensal

microorganisms, which can lead to pathologies such as inflammatory bowel disease, cancer, type 2 diabetes, cardiovascular disease, obesity and even mental illnesses such as depression.

Caseinolytic protein protease B, or ClpB, is a chaperone found in cells throughout the human body, but, is most abundant in the brain. Its function is to unfold misfolded proteins that could form clumps, and alterations in this protein can lead to metabolic and/or intestinal pathologies. Several studies show that the intestinal microbiota also produce functional homologues of this protein (e.g., *Escherichia coli*) and that it is involved in the regulation of satiety, possessing a small structural region similar to melanocyte-stimulating hormone or α -MSH, which makes it a potential mimetic of this function. In fact, a recent study shows that the bacterium *Hafnia alvei*, a symbiont of the gastrointestinal tract, and specifically its ClpB protein, could be used as a therapeutic approach to help obese individuals lose weight.

In the present Master's Thesis (TFM), the cloning and controlled overexpression of the ClpB protein encoded in the genome of the bacterium *Bacteroides uniformis* CECT 7771, a strain with probiotic potential capable of reducing body weight gain, as well as plasma levels of cholesterol, triglycerides, glucose and leptin in obese mice, has been proposed. The research carried out in the *Host-Interactions in Metabolic Health* laboratory of the "Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF)", where the present TFM was performed, suggests that this microorganism is also capable of modulating the intestinal microbiota and the immune alterations associated with obesity according to the latest results of their research.

Therefore, the aim of this study is to clone and purify the ClpB protein present in *Bacteroides uniformis*, and the *E. coli* homologue as control. For this purpose, molecular biology, biochemical and biotechnological techniques will be used with the ultimate aim of investigating whether the mechanism by which this bacterium positively modulates satiety in the host is due to the presence of ClpB, which mimics the activity of human α -MSH. In this way, it will be possible in the future to characterize and understand this molecular mechanism in depth in order to validate the use of this strain as a tool capable of solving the global problem of obesity.

Abreviaturas

α -MSH: Hormona melanoestimulante

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Amp: Ampicilina

APS: Persulfato de amonio

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosín Trifosfato

B. uniformis: *Bacteroides uniformis*

CCD: Dominio coil-coil

CD: Cúmulo de diferenciación

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

ClpB: Proteína caseinolítica peptidasa B

CTX: Ciclofosfamida

EE: Gasto energético

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido etilenodiaminatetraacético

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

Hsp100: Proteína de choque térmico 100

IE: Ingesta de energía

IFN: Interferón

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

MC4R: Receptores de melanocortina 4

NaCl: Cloruro de sodio

NBD: Dominio de unión a nucleótidos

NTD: Dominio N-terminal

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pET-15b: Plásmido pET-15b

POMC: Propiomelanocortina

PYY: Péptido YY

RPM: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecilsulfato sódico

SNC: Sistema nervioso central

TAE: Tampón Tris-acetato y EDTA

TBS: 3,4,5-Tribromosalicililida

TEMED: Tetrametiletlenodiamina

TM: Temperatura de fusión

TMF: Trasplante de microbiota fecal

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

Índice

1. Introducción

1.1. La microbiota

1.1.1. Microbiota intestinal y huésped

1.1.2. Cáncer y su relación con la microbiota

1.1.3. Microbiota y enfermedad inflamatoria intestinal

1.1.4. La microbiota y su influencia en la salud mental

1.2. Tratamientos enfocados a la microbiota: la dieta

1.2.1. Obesidad y trasplante de microbiota fecal

1.3. La saciedad y la proteína ClpB

1.3.1. Mecanismo de la saciedad

1.3.2. La proteína ClpB

1.3.2.1. Estructura y Función de la proteína ClpB

1.3.3. Relación de la proteína ClpB con el mecanismo de la saciedad

2. Objetivos

2.1. Objetivo principal

2.2. Objetivos específicos

3. Materiales y Métodos

3.1. Cultivos bacterianos

3.2. Protocolo de extracción de ADN bacteriano

3.2.1. Cuantificación del ADN bacteriano

3.3. Protocolo para crear bacterias competentes

3.4. Diseño de primers

3.5. Protocolo para clonar proteínas ClpB bacterianas

3.6. Protocolo de cuantificación del ADN extraído y secuenciación

3.7. Digestión enzimática

3.8. Protocolo de ligación

3.9. Transformación bacteriana

3.10. Protocolo de purificación de plásmidos

3.11. Prueba de sobreexpresión de la proteína ClpB

3.11.1. Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

- 3.12. Sobreexpresión y purificación de proteínas
- 4. Resultados
 - 4.1. Generación de los amplicones
 - 4.2. Transformación de bacterias DH5- α con el plásmido pET-15b y el inserto de ClpB
 - 4.3. Secuenciación de la construcción del plásmido pET-15b con el inserto del gen ClpB
 - 4.4. Sobreexpresión y purificación de la proteína ClpB
 - 4.5. Actividad de la proteína ClpB
 - 4.6. Alineamiento de la α -MSH con la proteína ClpB
- 5. Discusión
- 6. Conclusión
- 7. Referencias bibliográficas

Índice de tablas

- Tabla 1. Preparación del medio de conservación
- Tabla 2. Diseño de primers o cebadores
- Tabla 3. Reactivos para la preparación de una PCR.
- Tabla 4: Programa de PCR
- Tabla 5. Componentes para la preparación de la digestión enzimática.
- Tabla 6. Componentes para la preparación de la ligación
- Tabla 7. Preparación del buffer de lisis:
- Tabla 8. Reactivos y volúmenes del gel separador:
- Tabla 9. Reactivos y volúmenes del gel concentrador:
- Tabla 10. Elaboración del tampón de lavado
- Tabla 11. Elaboración del tampón de elución
- Tabla 12. Elaboración de Tampón de ensayo 5X
- Tabla 13. Elaboración de soluciones de ATP

Índice de figuras

- Figura 1. Modulación alimentaria temporal de la microbiota intestinal
- Figura 2. Estructura y organización de dominios de la chaperona ClpB
- Figura 3. Modelo de desagregación de proteínas por ClpB y el sistema de chaperonas DnaK
- Figura 4. Generación de amplicones del gen ClpB

- Figura 5. Transformación de bacterias *E. coli* DH5- α .
- Figura 6. Secuenciación del plásmido pET-15b con el inserto de ClpB de *E. coli* (Forward).
- Figura 7. Secuenciación del plásmido pET-15b con el inserto de ClpB de *E. coli* (Reverse).
- Figura 8. Secuenciación del plásmido pET-15b con el inserto de ClpB de *B. uniformis* (Forward).
- Figura 9. Secuenciación del plásmido pET-15b con el inserto de ClpB de *B. uniformis* (Reverse).
- Figura 10. Comprobación de los clones positivos con el constructo pET-15b + ClpB
- Figura 11. Sobreexpresión de la proteína ClpB de *E. coli* y *B. uniformis*.
- Figura 12. Purificación de la proteína ClpB de *E. coli* y *B. uniformis*.
- Figura 13. Actividad ATPasa de la enzima ClpB derivada de *E. coli* y *B. uniformis*

1. [Introducción](#)

1.1 [La microbiota](#)

1.1.1 [Microbiota intestinal y huésped](#)

En 2001 finalizó el proyecto del genoma humano, pero, tras este histórico acontecimiento, se argumentó que este “hito científico” de la biología y la genética estaría incompleto hasta que se comprendieran las diversas relaciones existentes entre el ser humano y los “microbios” que habitan en él¹. Es por ello, que posteriormente se han iniciado diferentes proyectos científicos cuyo fin es conocer las comunidades microbianas asociadas a los humanos, sus huéspedes. La descripción del metagenoma del tracto gastrointestinal, surgió como consecuencia directa del estudio del Proyecto del Microbioma Humano y sirvió para conocer los lugares por excelencia donde habitan nuestros microbios, a saber, la boca, la piel, la vagina y el intestino. De estas cuatro localizaciones, es la microbiota que reside en el intestino la que ha llamado más la atención por su importancia clínica asociada. El intestino humano (200-300m² de mucosa) es el “hábitat” de más de diez billones de diferentes simbiontes, conocidos de manera colectiva como microbiota^{2,3}. Además, muestra una gran plasticidad y puede adaptarse fácilmente a una gran variedad de estímulos, tanto ambientales como derivados del huésped. Por todas estas características, se considera la microbiota como un órgano más del cuerpo⁴.

Desde el nacimiento, y durante el resto de su vida, el individuo estará expuesto a multitud de factores que afectan a su microbiota. La microbiota intestinal infantil temprana, se ve afectada por la dieta materna durante y después del embarazo, el modo del parto, las prácticas de lactancia y la nutrición temprana. Estudios recientes, indican que la microbiota intestinal en etapas tempranas del desarrollo humano está condicionada por la nutrición temprana y el desarrollo del huésped, caracterizado por distintos taxones microbianos discriminatorios por la edad. Curiosamente, estas firmas de taxones microbianos pueden predecir el crecimiento normal y el estado de nutrición de los bebés. Sin embargo, no está claro qué otros factores internos y externos determinan la colonización y maduración microbiana en el individuo⁴⁻⁷.

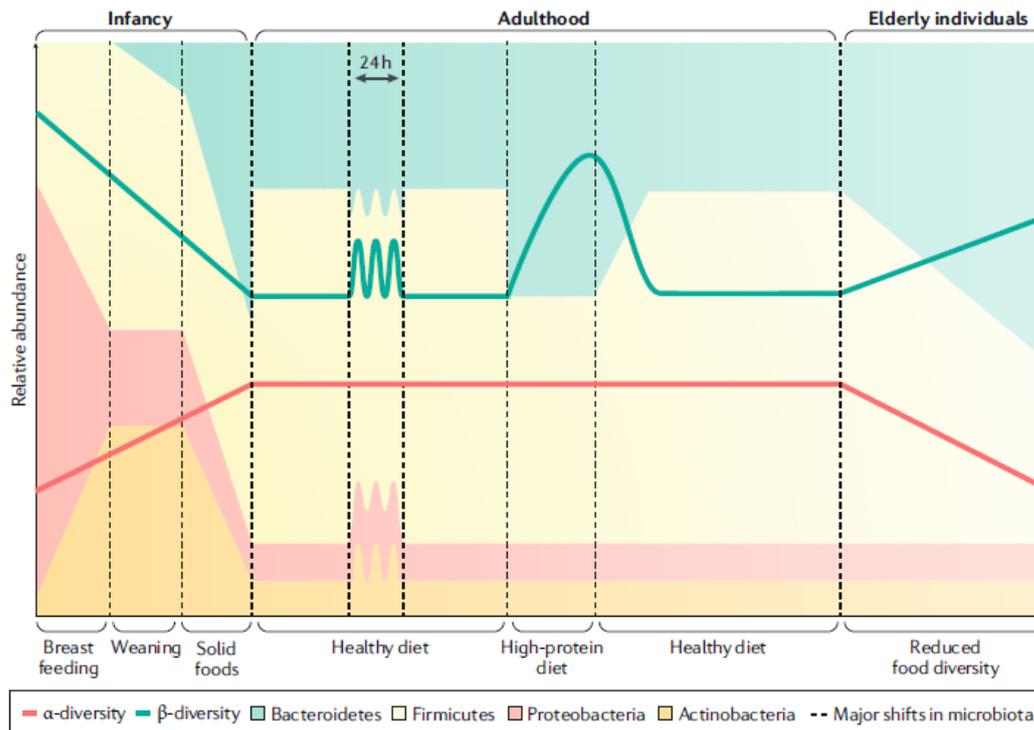


Figura 1. Modulación alimentaria temporal de la microbiota intestinal. Figura adaptada de Zamora *et al.*, Nature (2018). La dieta influye en la organización y función de las bacterias intestinales a lo largo de la vida humana. Las alteraciones de la microbiota reflejan las adaptaciones a los cambios nutricionales en diferentes marcos temporales: las oscilaciones diurnas corresponden a los ciclos de sueño-vigilia y alimentación-ayuno; las alteraciones importantes en la composición y las cantidades de alimentos desencadenan cambios transitorios en la microbiota, que persisten más tiempo que la duración de la perturbación dietética; y las prácticas dietéticas de larga duración provocan cambios en la microbiota intestinal. La línea azul indica el grado de semejanza de la configuración de la microbiota en un momento determinado con una configuración homeostática arbitraria durante la edad adulta (β -diversidad). La línea roja indica la riqueza microbiana fecal (α -diversidad). Los colores de fondo indican las abundancias típicas de taxones durante cada fase⁴.

La microbiota del tracto gastrointestinal influye en distintas funciones que se llevan a cabo en el cuerpo tanto a nivel local como sistémico, algunas de ellas son: su destacado papel en la digestión de alimentos, la producción de vitaminas, la protección contra patógenos o incluso su estrecha y recién conocida relación con el sistema nervioso (conocida como el eje intestino-cerebro)^{1,8}. Algunas de los filos que predominan en el tubo digestivo son los Bacteroidota, de los cuales se hablará más en profundidad en este estudio, los Bacillota o las Actinomycetota. La distribución de estas bacterias en el intestino es muy importante, ya que cuando hay algún desbalance en la proporción de estos filos, o, un aumento en otros minoritarios, se produce una inestabilidad en la homeostasis que puede desembocar en una situación de patología, entre ellas, algunas de las que tienen mayor repercusión, se explican a continuación^{1,9-11}.

1.1.2 [Cáncer y su relación con la microbiota](#)

Aunque en general se considera que el cáncer es una enfermedad que depende mayoritariamente de la genética del huésped y de factores ambientales, los microorganismos están implicados en el ~20% de las neoplasias malignas humanas^{12,13}. Los microbios presentes en las mucosas pueden pasar a formar parte del microambiente tumoral, como es el caso de las neoplasias malignas del tracto aerodigestivo, y estos microbios intratumorales pueden afectar al crecimiento y la propagación del cáncer de muchas maneras^{12,14-18}.

La posibilidad de terapias contra el cáncer basadas en microbios ha despertado interés desde las toxinas de Coley (una de las primeras formas de bacterioterapia contra el cáncer) hasta la era actual de los microbios de diseño y los trasplantes de microbiota de la biología sintética^{12,19}.

Las formas en que la microbiota contribuye a la carcinogénesis, ya sea aumentando o disminuyendo el riesgo del huésped, se dividen en tres grandes categorías: (i) alterar el equilibrio entre la proliferación y la muerte de las células del huésped, (ii) guiar la función del sistema inmunitario, e (iii) influir en el metabolismo de los factores producidos por el huésped, los alimentos ingeridos y los productos farmacéuticos¹².

Varios estudios notables han destacado bacterias comensales beneficiosas asociadas con la respuesta a la terapia del cáncer²⁰. Especies como *Akkermansia muciniphila*²¹, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Phascolarctobacterium faecium*²², *Bifidobacterium longum* y *Collinsella aerofaciens*²³ se han asociado con la respuesta a los inhibidores del punto de control inmunitario en pacientes con cáncer de pulmón y melanoma. Estas especies intestinales influyen en la respuesta a la quimioterapia y la inmunoterapia provocando una respuesta beneficiosa del sistema inmunitario en modelos de ratón²⁰.

Algunas especies son capaces de aumentar las poblaciones inmunitarias citotóxicas, por ejemplo, *Enterococcus hirae* y *Barnesiella intestinihominis* han demostrado la capacidad de modular positivamente la respuesta inmunitaria a la ciclofosfamida (CTX). Tras la inyección de CTX, *E. hirae* fue capaz de aumentar la proporción de linfocitos T CD8 intratumorales mediante la translocación a órganos linfoides secundarios, mientras que, tras la CTX, *B. intestinihominis* fue capaz de promover las células IFN- γ /T intratumorales, lo que resultó en una reducción del tamaño del tumor²⁴. Otras especies, modulan positivamente la respuesta inmunitaria mediante la producción de citocinas inmunoestimuladoras. Por ejemplo, *Alistipes shahii* provoca un aumento de la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por las células mieloides intratumorales en respuesta a la inmunoterapia en modelos de ratón²⁵.

1.1.3 [Microbiota y enfermedad inflamatoria intestinal](#)

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, es un trastorno inflamatorio crónico del intestino que afecta a alrededor de 8 millones de personas en el mundo²⁶. Aunque la patogénesis de la EII es poco conocida, múltiples líneas sugieren que está causada por la confluencia de factores genéticos y ambientales que alteran la homeostasis intestinal, desencadenando una reacción inflamatoria en individuos genéticamente susceptibles²⁷. Los estudios genéticos, han identificado más de 200 loci que regulan el riesgo de EII, la mayoría asociados a vías que regulan el crecimiento microbiano, las respuestas inmunitarias a los microorganismos y el refuerzo de la barrera intestinal^{28,29}.

Un aspecto clave de ambas formas de patogénesis de la EII, es su relación con la presencia de los microorganismos simbióticos que viven en el tracto intestinal. Mientras que la gran mayoría de los microorganismos intestinales viven en una relación mutualista con el huésped, algunos organismos simbióticos, como *Mucispirillum schaedleri* y las especies de *Helicobacter*, suelen denominarse patobiontes porque pueden causar enfermedades en determinadas condiciones. Los defectos genéticos que provocan una alteración de la composición de la microbiota, comprometen los efectos beneficiosos que algunos microorganismos ejercen sobre la inmunidad del huésped^{30,31}.

El análisis por secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S de muestras de heces y mucosa ha revelado la presencia de una alteración en la microbiota, caracterizada por una disminución de la diversidad de la comunidad y un cambio en los taxones bacterianos, incluidas alteraciones del filo *Bacillota* y una mayor abundancia de especies de *Enterobacteriaceae*^{32,33}. En los pacientes con EII crónica, la diversidad y composición de la microbiota intestinal están sistemáticamente alteradas. Se ha demostrado que *F. prausnitzii*, una de las bacterias más abundantes de la microbiota intestinal humana, con una proporción de aproximadamente el 5% del total de bacterias fecales, induce efectos antiinflamatorios³⁴. Muchos estudios han demostrado que *F. prausnitzii* y *A. muciniphila* estaban disminuidas en pacientes con EII, presentando una reducida función de barrera³⁵⁻³⁷. La suplementación de la microbiota intestinal de ratones con colitis inducida con *F. prausnitzii* condujo a una marcada atenuación de la colitis, pérdida de peso, una disminución de citoquinas proinflamatorias y un

aumento de citoquinas antiinflamatorias, lo que demuestra una vez más la clara interacción entre la microbiota y las enfermedades inflamatorias intestinales³⁵.

1.1.4 [La microbiota y su influencia en la salud mental](#)

Recientemente se ha asociado de manera significativa la labor que realiza la microbiota con el estado de la salud mental del individuo. Cada vez hay más pruebas de que las bacterias intestinales desempeñan un papel en trastornos psiquiátricos como la depresión, la esquizofrenia o el autismo. Los mecanismos precisos que sustentan estas observaciones requieren todavía elaboración, aunque se han identificado varias pistas importantes basadas en la regulación microbiana de las vías de señalización del eje intestino-cerebro. Esto incluye la programación del sistema inmunitario, la estimulación del nervio vago, o la regulación del metabolismo del triptófano, que son capaces de influir en la fisiología del huésped, la función cerebral y el comportamiento^{38,39}. Las enzimas microbianas intestinales participan en la síntesis y degradación de numerosas moléculas de señalización importantes en el eje intestino-cerebro, como neurotransmisores (serotonina, dopamina y ácido gamma-aminobutírico [GABA]), ácidos grasos de cadena corta, ácidos biliares y metabolitos de la colina^{38,40}.

Un ejemplo de cómo una enfermedad mental puede verse influida por la microbiota, es el caso de la depresión y los niveles de testosterona⁴¹. Los conocimientos actuales en torno a la investigación del trasplante de microbiota fecal (TMF)⁴² fueron el enfoque inicial para demostrar que la microbiota intestinal de un individuo donante de heces deprimido con bajos niveles de testosterona, era suficiente para inducir una reducción de la testosterona tanto en el suero como en el cerebro, así como un fenotipo conductual similar a la depresión en los animales receptores⁴³. Los niveles de testosterona en suero se han correlacionado con la diversidad y composición microbiana en un estudio clínico que sugiere una importante contribución de la testosterona luminal a las concentraciones sistémicas circulantes⁴⁴. Aislado *Mycobacterium neoaurum* de muestras fecales de los pacientes e introduciéndolo en animales gnotobióticos o libres de gérmenes, Li et al⁴³ pudieron recapitular características conductuales clave de la depresión. Se vincularon estas observaciones a una enzima bacteriana específica, la 3b-HSD, capaz de degradar la testosterona. También generaron una *Escherichia coli* modificada genéticamente (una bacteria intestinal que originalmente carecía de la enzima que degrada la testosterona) para expresar el gen 3b-HSD, cuya administración promovió la aparición de un fenotipo similar a la depresión, coherente con el perfil conductual y neurobiológico observado tras el TMF o la inoculación de *M. neoaurum*. En conjunto, estos datos muestran la importancia y el valor de ir más allá de las evaluaciones de la composición

de la microbiota intestinal y avanzar hacia lecturas funcionales que incluyan el estudio de las enzimas microbianas en la salud y la enfermedad^{38,43}.

1.2 Tratamientos enfocados a la microbiota: la dieta

Las observaciones recientes en terapias dirigidas hacia la microbiota, como los almidones resistentes a los prebióticos (fibra), los probióticos y los trasplantes de microbiota fecal (TMF), brindan oportunidades novedosas para prevenir y tratar enfermedades como las anteriormente mencionadas y muchos más ejemplos, complementando los tratamientos farmacológicos tradicionales^{45,46}.

Cuando se consideran las influencias ambientales sobre el microbioma intestinal, la dieta es uno de los factores más importantes que afectan a la composición, diversidad, patrones y estructura de la comunidad microbiana, lo que a su vez puede repercutir en diversas respuestas metabólicas del huésped. Son varios los estudios en modelos animales que demuestran un impacto significativo de la dieta en la composición y función de la microbiota intestinal, lo que conlleva a la alteración entre la interacción huésped-microbiota. Los efectos inducidos por la dieta en la microbiota intestinal son profundos, con un impacto duradero en el fenotipo del huésped en modelos animales. En los seres humanos, sin embargo, los efectos duraderos sólo se observan en contados estudios de intervención a largo plazo, y deberían realizarse más experimentos para conocer de manera más detallada los posibles efectos^{45,47,48}.

1.2.1 Obesidad y trasplante de microbiota fecal

La obesidad se está convirtiendo rápidamente en una epidemia mundial y su tratamiento es un reto prioritario para frenar esta tendencia. Esta enfermedad, siempre se ha interpretado como una desviación del estado energético normal que podría tratarse simplemente reduciendo la ingesta de energía (IE) y/o aumentando el gasto energético (EE). Sin embargo, cada vez hay más pruebas que indican que la IE y la EE están interconectadas y reguladas por mecanismos complejos y coordinados que, en última instancia, influyen en los centros hipotalámicos, límbicos, del tronco cerebral y otros centros del SNC para regular la ingesta de alimentos y el EE^{45,49}.

Diversos estudios de intervenciones dietéticas para la pérdida de peso buscan cambios en la composición de la microbiota, lo que conlleva la mejora de la función metabólica. De

hecho, mediante la transferencia de microbiota fecal (TMF) se ha conseguido la recuperación del fenotipo metabólico funcional de los donantes en los receptores del TMF, presumiblemente como consecuencia de la transmisión y colonización de los microbios transferidos, hecho que se demuestra muy poco en los ensayos clínicos de este tipo^{45,50,51}.

Un ejemplo relacionado con este tema es como el TMF utilizando microbiota de donantes obesos, conduce a un aumento de la masa grasa (adiposidad) e hiperfagia. Y por el lado contrario, parece ser que los cambios microbianos inducidos por la microbiota de individuos sanos parece potenciar las sales biliares circulantes y mejorar la tolerancia a la glucosa de los organismos receptores^{45,52,53}.

Sin embargo, es necesario realizar más estudios, ya que, independientemente de la enfermedad, se sabe poco sobre la estabilidad de las comunidades trasplantadas, la necesidad de intervenciones repetidas de TMF, la duración del TMF, la necesidad de una intervención dietética concomitante que facilite el mantenimiento de los taxones explantados y, finalmente, su relevancia en el tratamiento de la obesidad⁴⁵.

1.3 [La saciedad y la proteína ClpB](#)

1.3.1 [Mecanismo de la saciedad](#)

Los posibles mecanismos que relacionan la microbiota intestinal con el control de la ingesta de alimentos pueden implicar la producción de transmisores y metabolitos neuroactivos. Otra posibilidad, es que las proteínas bacterianas derivadas de la microbiota generados tras la lisis bacteriana, puedan actuar directamente sobre las vías de control del apetito a nivel local en el intestino o a nivel sistémico por medio de la circulación. Se ha demostrado que algunas proteínas bacterianas muestran homología de secuencia con las hormonas peptídicas humanas, lo que adquiere especial relevancia en el campo de la saciedad coordinada desde un eje microbiota-huésped⁵⁴⁻⁵⁷. Por ejemplo, las proteínas producidas por bacterias comensales, como *Escherichia coli* que reside en el epitelio intestinal, estimulan la señalización de la saciedad en roedores^{54,58}. El aumento de la prevalencia de *E. coli* en personas anoréxicas en comparación con las obesas también apoya el posible papel de estas bacterias intestinales comunes, en la señalización de la saciedad del huésped^{58,59}.

En investigaciones realizadas *in vitro*, en ambientes controlados, las bacterias suelen responder a los nutrientes dividiéndose y creciendo exponencialmente hasta que alcanzan una densidad umbral de unas 10^9 - 10^{12} células/mL en la que entrarán en la fase estacionaria de crecimiento.

Actualmente, se acepta que los macronutrientes derivados de las comidas, es decir, las proteínas, las grasas y los hidratos de carbono, así como los productos de su digestión, activan las vías de la saciedad intestinal uniéndose a los receptores expresados por las células enteroendocrinas^{58,60}. Recientemente se ha demostrado que el suministro de nutrientes regulares a *E. coli*, imitando dos comidas diarias, induce un crecimiento que continúa 20 minutos, antes de entrar en la fase estacionaria. Se observó una dinámica similar de crecimiento bacteriano *in vivo*, tras la infusión de un medio nutritivo en el colon de la rata y, además, la infusión de proteínas de *E. coli* 2 h después del inicio de la fase estacionaria estimuló la secreción de PYY^{54,58}. Estos datos demuestran que la dinámica de crecimiento bacteriano inducida por nutrientes en el intestino se corresponde temporalmente con la activación de las vías de saciedad intestinal, incluida la secreción de PYY. Esto sugiere un papel funcional de las bacterias intestinales en la regulación del apetito del huésped^{58,61}.

1.3.2 [La proteína ClpB](#)

Las proteínas de tipo ClpB se consideran constitutivas de las bacterias por su alta ocurrencia en los genomas de dichos microorganismos. Se le denomina proteína caseinolítica proteasa B (ClpB) o Hsp100 en eucariotas, y una de las principales chaperonas para asistir el plegamiento correcto de proteínas de las bacterias, levaduras, plantas y mitocondrias, siendo esencial para la supervivencia celular. Recientemente se le ha atribuido una gran relevancia en el ámbito del control de la saciedad⁶²⁻⁶⁴.

1.3.2.1 [Estructura y Función](#)

Al igual que otras proteínas Hsp100, las proteínas ClpB forman un anillo hexamérico, en el que cada protómero comprende un dominio N-terminal (NTD), un dominio α -helicoidal globular de 150 residuos y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) separados por un único dominio regulador en espiral esencial para la unión a la chaperona Hsp70 (DnaK), esencial en la participación de la solubilización y reactivación de agregados proteicos (Fig. 2 A y B). Ambos dominios NBDs contienen motivos “Walker A” y “Walker B”, necesarios para la unión e hidrólisis de nucleótidos, respectivamente, y una tirosina altamente conservada en los distintos organismos, que juega un papel crítico en la desagregación. Cada una de las tirosinas

conservadas de un protómero se localiza en un denominado: “bucle de poro” (Fig. 2C) y se extiende para interactuar directamente con residuos cargados positivamente y aromáticos del sustrato unido^{62,65,66}. La mutación de estas tirosinas del bucle de poro de NBD-1 conduce a una reducción parcial de la actividad de desagregación de la proteína ClpB. Cuando esta mutación se combina con la delección del NTD, el doble mutante resultante es completamente inactivo e incapaz de llevar a cabo la desagregación de sustrato. Se ha sugerido que la pérdida completa de actividad con el doble mutante ClpB es el resultado del solapamiento de las funciones de unión a sustrato de los residuos de tirosina del poro de NBD1 y del NTD de ClpB^{62,63,67}.

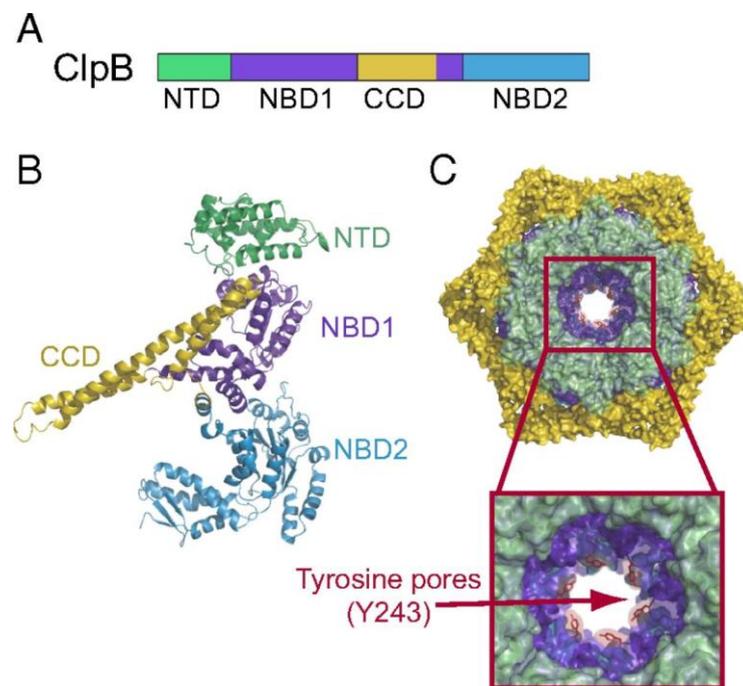


Figura 2. Estructura y organización de dominios de la chaperona ClpB. Figura extraída de: *Rosenzweig et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. Organización de dominios (A) y estructura protomérica (B) de la chaperona ClpB. El protómero ClpB consta de un dominio N-terminal (NTD; verde), dos dominios de unión a nucleótidos (NBD1, NBD2; azul oscuro y azul claro, respectivamente), y una inserción de dominio “coil-coil” (CCD; amarillo). (C) Los monómeros se ensamblan en un hexámero compuesto por tres anillos formados por NTDs (anillo superior; verde), NBD1-CCD (azul-amarillo), y NBD2 que encierra el poro central. El recuadro muestra una vista ampliada de los bucles del poro central de NBD1 con las tirosinas conservadas (Y243; representadas como “palitos” rojos) que se extienden hacia el canal axial. Este modelo de hexámeros de ClpB se basa en estructuras de microscopía crioeléctrica de ClpB de *E. coli*⁶².

Como se observa en la figura 3, la recuperación de proteínas funcionales a partir de agregados por parte de ClpB requiere la interacción sinérgica con una segunda chaperona, previamente mencionada, DnaK^{64,67}. A través de sus cochaperonas DnaJ y GrpE, DnaK se une inicialmente a los agregados, dando lugar a la exposición de segmentos peptídicos que pueden

ser reconocidos por ClpB⁶⁷⁻⁶⁹. A continuación, DnaK recluta a ClpB al lugar de agregación mediante una interacción física directa^{67,70,71}, transfiriendo el agregado a ClpB. Utilizando la energía derivada de la hidrólisis de ATP, ClpB desenreda el agregado “enhebrando” cadenas polipeptídicas individuales, de una en una, a través del poro central de su anillo hexamérico^{67,72}. Una vez liberados del agregado, los polipéptidos desplegados pueden volver a plegarse espontáneamente o con la ayuda de chaperonas celulares adicionales⁶⁷.

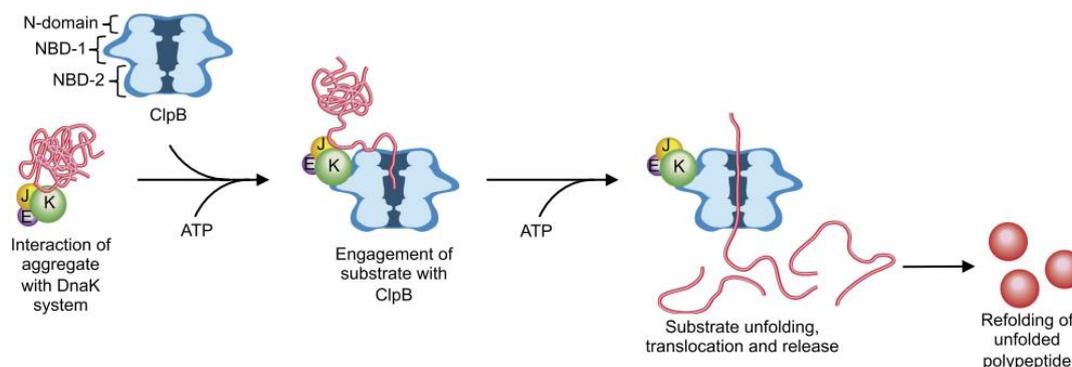


Figura 3. Modelo de desagregación de proteínas por ClpB y el sistema de chaperonas DnaK. Figura extraída de: *Rosenzweig et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015. Los bucles del poro en NBD-1 y NBD-2 se representan mediante proyecciones en el poro central. Por otra parte, el sistema DnaK (DnaK, DnaJ y GrpE) se une a los agregados proteicos. A través de interacciones entre DnaK y ClpB, el agregado llega a ClpB y se unen a través de regiones expuestas en la superficie del agregado mediante el dominio N de ClpB y el bucle de poro-1. Tras el acoplamiento, el polipéptido se transloca a través del canal de ClpB en una reacción que requiere hidrólisis de ATP. Finalmente, el polipéptido desplegado se libera y se vuelve a plegar espontáneamente o con la ayuda de otras chaperonas⁶⁷.

1.3.3 [Relación de la proteína ClpB con el mecanismo de la saciedad](#)

La secuencia de la proteína ClpB tiene un motivo similar a -MSH reconocido por el anticuerpo -MSH. La proteína α -MSH es un neuropéptido anorexigénico bien descrito, producido por las neuronas de proopiomelancortina (POMC), desempeña un papel en la señalización de la saciedad mediante la activación de los receptores de melanocortina 4 (MC4R). La activación de MC4R en las células enteroendocrinas del intestino estimula la liberación de la hormona saciante: péptido YY (PYY). Por lo tanto, se sabe que es posible la señalización intestinal local por parte de moléculas similares a la α -MSH derivadas de la microbiota hacia las células enteroendocrinas, siendo éste el caso de la proteína ClpB^{58,73,74}.

Como se ha comentado anteriormente, en ocasiones no es la microbiota intestinal la que está implicada directamente en la regulación de la saciedad por sí misma, sino que son los metabolitos que esta misma produce los que pueden producir esta función. *Breton et al*⁵⁴ realizó un estudio en 2016 en el que se pone de manifiesto cómo el suministro regular de nutrientes estabiliza el crecimiento de *E. coli*, y la fase estacionaria 20 minutos después del

suministro de nutrientes va acompañada de cambios en el proteoma bacteriano, lo que sugiere la participación de las proteínas bacterianas en la saciedad. De hecho, las infusiones intestinales de proteínas de fase estacionaria de *E. coli* aumentaron el PYY en plasma y suprimieron la ingesta de alimentos, activando c-Fos en las neuronas hipotalámicas POMC, mientras que sus administraciones repetidas redujeron el tamaño de las comidas. ClpB fue regulada al alza en la fase estacionaria de *E. coli*, se detectó en el plasma de forma proporcional al ADN de ClpB en las heces, y estimuló la tasa de activación de las neuronas del hipotálamo. Por lo tanto, estos datos sugieren que las proteínas bacterianas producidas después del crecimiento de *E. coli* pueden señalar la terminación de la comida, pudiendo además influir en el patrón alimentario a largo plazo mediante la exposición continua a proteínas de *E. coli*^{58,73}.

En el trabajo de Dominique et al. (2019) se concluyó que la producción de la proteína ClpB por parte de las *E. coli* intestinales es dependiente de la ingesta de macronutrientes, principalmente proteínas que estimulan los niveles de ARNm de ClpB. Junto con los efectos dependientes de dosis de ClpB sobre la secreción de PYY por parte de las células de la mucosa intestinal, los datos apoyan una posible relación entre el ClpB de *E. coli* y la producción de PYY, lo que en otras palabras quiere decir que ClpB interviene en la señalización de la saciedad inducida por proteínas en el intestino^{58,73,75}.

Derivado de este estudio, Legrand et al. (2020) publicó recientemente un artículo en el que propusieron a *Hafnia alvei*, una bacteria comensal del intestino productora de ClpB, como un potencial probiótico capaz de modular el control del apetito y el peso corporal en casos de sobrepeso y obesidad. Los resultados mostraron que la cepa *H. alvei* HA4597 reducía la ingesta de alimentos, el peso corporal y el aumento de masa grasa en ratones hiperfágicos y obesos. Estos datos, combinados con la escasa abundancia del gen ClpB en la microbiota de los humanos obesos, parecen justificar el uso de *H. alvei* como probiótico para el control del apetito y el peso corporal en casos de sobrepeso y obesidad⁷⁶⁻⁷⁸.

Un estudio posterior, de 2021, demuestra la eficacia del *Hafnia alvei* en humanos por estar asociada a la pérdida de peso corporal, a una reducción significativa de la circunferencia de la cadera y a una mayor sensación de saciedad en sujetos con sobrepeso. Y hasta donde se sabe, ésta es la primera demostración clara de la eficacia de una cepa probiótica sobre la pérdida de peso y la saciedad en un estudio aleatorizado controlado con placebo^{54,55,79,80}.

En el presente estudio, planteamos estudiar la proteína ClpB producida por la bacteria comensal de la microbiota intestinal *Bacteroides uniformis* CECT 7771 por su relevante implicación en los mecanismos de la saciedad humana. Esta bacteria, es utilizada como modelo de estudio en el laboratorio de desarrollo de este TFM porque se ha demostrado que puede reducir el aumento del peso corporal y los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos, glucosa y leptina, mejorando también la tolerancia oral a la glucosa en ratones obesos. Además, esta bacteria es capaz de modular la microbiota intestinal y las alteraciones inmunitarias asociadas a la obesidad, aumentando las células T reg y reduciendo los linfocitos B, los macrófagos totales y la relación M1/M2 tanto en el intestino como en el tejido adiposo de ratones obesos⁸¹.

Por otro lado, para este estudio, también se ha seleccionado la proteína ClpB de *E. coli* por su ya conocida implicación en los mecanismos de la saciedad, por lo que será utilizada como control del estudio⁵⁸.

Debido al papel descrito de ClpB como proteína moduladora del apetito, su implicación en la actividad metabólica y cómo parece ser altamente eficaz disminuyendo el peso corporal en ratones modelo de obesidad y recientemente en humanos en la bacteria *Hafnia alvei*, cabe esperar que la proteína ClpB de *Bacteroides uniformis* CECT 7771 esté implicada también en la regulación del apetito.

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Máster es clonar el gen de la proteína de tipo ClpB de la bacteria *Bacteroides uniformis* CECT 7771, ya que ha demostrado tener un papel importante en la regulación de la saciedad, el control del metabolismo de la glucosa y el control del peso corporal. También se clonará el gen de la enzima ClpB de *Escherichia coli* que servirá de control en estudios funcionales.

2.2 Objetivo específico:

- Estudiar las diferencias entre proteínas homólogas de una especie conocida: *Escherichia coli*, y una especie que ha demostrado tener gran implicación en el control de la saciedad: *Bacteroides uniformis* CECT 7771.

- Realizar la sobreexpresión de las proteínas ClpB de las bacterias, *E. coli* y *B. uniformis*, mediante un procedimiento de auto-inducción y purificarlas, para terminar caracterizando bioquímicamente la proteína obtenida y comprobar si mantiene la función biológica.

3. Materiales y métodos

3.1 Cultivos bacterianos

En este estudio, se emplearon las cepas K12, BL21-DE3 y DH5- α de la especie *Escherichia coli* y la cepa *Bacteroides uniformis* CECT7771, todas ellas cedidas desde diferentes colecciones de microorganismos de referencia y/o obtenidas comercialmente. Las cepas fueron almacenadas a -80°C hasta su uso, lo que requiere que sean cultivadas en medio LB con agitación a 150 rpm y a 37°C . En el caso de *B. uniformis*, dicha cepa requiere crecimiento en anaerobiosis estricta y en medio Schadler a 37°C .

3.2 Protocolo de extracción de ADN bacteriano

Se extrajo el ADN total de los cultivos de las bacterias *Escherichia coli* de la cepa K12 y también de *Bacteroides uniformis* CECT7771. Para ello, se resuspendieron las bacterias en agua libre de nucleasas a la que se añadieron 300 μL de buffer de lisis (6M guanidina-HCl). Se mezcló suavemente mediante vórtex 30 segundos y se incubó la solución durante 10 minutos a 60°C en un termobloque en agitación a 1000 rpm. Después, se añadieron 100 μL de acetato de amonio, se invirtió el tubo varias veces para mezclar el contenido y se incubó en hielo durante 10 minutos. Finalizado el tiempo, se centrifugó a 4°C , y a 16.000 x g durante 5 minutos para recuperar el sobrenadante, al cual se adicionó 500 μL de propanol congelado a -20°C . Se centrifugó de nuevo 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 300 μL de etanol congelado a -20°C y se realizó otra centrifugación en las mismas condiciones que la anterior. Por último, se añadieron 50 μL de agua ultrapura al pellet resultante, el ADN bacteriano.

3.2.1 Cuantificación del ADN bacteriano

Para la cuantificación del ADN bacteriano de las células de *E. coli* y *B. uniformis*, se utilizó el fluorímetro *Qubit 4.0* (ThermoFisher, Invitrogen). Para realizar la cuantificación, se mezclaron 199 μL de *Qubit buffer* con 1 μL de la muestra de ADN bacteriano a analizar en cada caso, y finalmente, se conservó el ADN congelado a -20°C . Los resultados se obtuvieron en ng/ μL .

3.3 Protocolo para crear bacterias competentes

Para la preparación de bacterias competentes se utilizaron las cepas de *E. coli* DH5- α y BL21-DE3, seleccionadas específicamente para la obtención de clonajes de los genes en plásmidos de expresión y para estudios de sobre-expresión, respectivamente.

Se inocularon las bacterias en 10 mL de medio LB con agitación a 150 rpm a 37°C durante toda la noche en matraces de 25 mL. Al día siguiente, se añadieron 400 μ L de la solución con las bacterias a un matraz estéril con 40 mL de medio LB, hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0.6 (aproximadamente 2-3 horas). Posteriormente, se incubaron las células en hielo durante 10 minutos y se transfirió el cultivo a dos tubos nuevos de 50 mL (25 mL cada uno) que se centrifugaron a 3500 x g durante 20 minutos a 4°C.

Una vez pasado el tiempo de centrifugación, se descartó el sobrenadante por inversión, se disgregó el pellet por vórtex y se añadieron 10 mL de CaCl₂ 0.1M enfriado previamente en hielo. Se incubó la suspensión en hielo durante 20 minutos y se volvió a centrifugar a 3500 x g durante 20 minutos a 4°C. Se resuspendió el sedimento en 1.25 mL de medio de conservación y se distribuyó la solución resultante en alícuotas de 90-100 μ L en tubos de 1.5 mL que se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Tabla 1. Preparación del medio de conservación

Reactivos	Volumen
Medio LB	2.5 mL
Cloruro cálcico (CaCl ₂)	2.5 mL
Glicerol estéril	1 mL

3.4 Diseño de primers

Para el diseño de primers se utilizó el plásmido pET-15b como vector para clonar el gen ClpB y transformar posteriormente las bacterias *E. coli* DH5- α . Por un lado, se empleó el programa *Webcutter* (<http://heimanlab.com/cut2.html>) para elegir las enzimas de restricción que iban a ser utilizadas para cortar tanto el plásmido como el gen extraído de las bacterias. Finalmente, fueron

seleccionadas para los experimentos, las enzimas *Xba*I y *Nde*I. Por otro lado, se diseñaron los primers que amplificaron el fragmento que contiene el gen *ClpB* mediante un posterior procedimiento de PCR.

Se ajustaron los parámetros del programa para obtener primers con una temperatura de fusión (T_m) de entre 55 y 65°C, un contenido de G+C del 50%, una longitud de entre 18 y 25 pb y una elevada especificidad. Se incluyeron en los primers los sitios de restricción *Xba*I y *Nde*I para facilitar la clonación posterior del fragmento en otro vector. Los primers diseñados fueron los siguientes.

Tabla 2. Diseño de primers o cebadores. Los nucleótidos que aparecen en negro son los pertenecientes a la secuencia del plásmido que debe ser reestablecida al usar una diana fuera del MCS (*multiple cloning site*), los que aparecen en naranja son la diana de la enzima de restricción en cuestión, en morado una cola de nucleótidos que sirve para mejorar el reconocimiento de la diana de restricción por parte de las enzimas, en rojo la secuencia codificante para la cola de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína, en verde son los nucleótidos de reconocimiento por parte del ribosoma para la traducción del gen, y en azul la región específica que hibrida con cada gen *ClpB*.

	<i>E. coli</i>	<i>B. uniformis</i>	T_m (°C)
Primer forward <i>Xba</i> I	5'GATATCTAGAAATAATTTT GTTTAACTTTAAGAAGGAGA TATACCATGCGTCTGGATCG TCTTACTAATAAA3'	5'GATATCTAGAAATAATTTT GTTTAACTTTAAGAAGGAGA TATACCATGAACTTTTAACAA CTTTACCATTAAAGCG3'	60°C y 63.9°C
Primer reverse <i>Nde</i> I	5'GATACATATGTTATTAGTG ATGGTGATGGTGATGCTGG ACGGCGACAATCCGGT'3'	5'GATACATATGTTATTAGTG ATGGTGATGGTGATGATTTTC TGAAAACCAAGTCCGTCGTC 3'	61°C y 63.6°C

Los primers fueron sintetizados por la empresa *Eurofins Genomics*, y se recibieron liofilizados. En el laboratorio se diluyeron con agua ultra libre de nucleasas a una concentración de 100 μ M, según indicaciones del fabricante, y también se preparó una solución de trabajo a 10 μ M. Finalmente, se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.5 [Protocolo para clonar proteínas *ClpB* bacterianas](#)

Una vez se extrajo el ADN bacteriano como se ha explicado anteriormente en el apartado 3.2, se realizó la amplificación por PCR de los genes diana usando los primers o cebadores que se habían obtenido en el apartado anterior.

Se realizó una PCR específica para amplificar el gen ClpB a partir del ADN total procedente de las bacterias *Escherichia coli* y *Bacteroides uniformis*, utilizando los primers **CLPB-ECOLI-F1** (5'-GATATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATGCGTCTGGA TCGTCTTACTAATAAAA-3') y **CLPB-ECOLI-R1** (5'-GATACATATGTTATTAGTGATGGTGATGGTGATGCT GGACGGCGACAATCCGGT'-3') y **CLPB-BUNIF-F1** (5'GATATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA AGGAGATATAACCATGAACTTTTAACAACCTTACCATTAAAGCG-3') y **CLPB-BUNIF-R1** (5'GATACATAT GTTATTAGTGATGGTGATGGTGATGATTTCTG AAAACCAGTCCGTCGTC-3') respectivamente.

Para realizar este procedimiento, se prepararon las siguientes mezclas para la PCR:

Tabla 3. Reactivos para la preparación de una PCR.

Reactivos	Clonación de ClpB <i>E. coli</i>	Clonación de ClpB <i>B. uniformis</i>	Volumen Total 40µL
Agua	22µL	22µL	
NzyTaq II Green Master Mix	15µL	15µL	
Primer forward	1µL	1µL	
Primer reverse	1µL	1µL	
ADN bacteriano	1µL	1µL	

Posteriormente, se realizó el programa de amplificación con los tubos preparados:

Tabla 4. Programa de PCR

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	-
Desnaturalización	95°C	20 s	30 ciclos
Alineamiento	59°C	30 s	30 ciclos
Extensión	72°C	3 min	30 ciclos
Extensión final	72°C	5 min	-

Finalmente, se analizaron los productos resultantes de la PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X. Para realizar este procedimiento, se utilizó un marcador de peso molecular para caracterizar el tamaño de las bandas, un control negativo sin muestra de ADN bacteriano, y la muestra a analizar que debía sobreexpresar el gen.

3.6 [Protocolo de cuantificación del ADN extraído y secuenciación](#)

Una vez confirmado con la electroforesis que se disponía del fragmento correspondiente al gen de ClpB, se utilizó el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) para purificar los productos de PCR. Los amplicones se mezclaron con el buffer PB (Binding buffer) proporcionado por el kit en una relación 1:5 respectivamente y se transfirió la mezcla a una columna *QIAquick*. La columna se centrifugó 1 minuto a 12.000 x g para permitir que el ADN se uniera a la membrana de sílica mientras que las impurezas pasaban a través de ella. Luego, la columna se lavó con buffer PE (Washing buffer) para eliminar cualquier impureza restante y se centrifugó 1 minuto a 12.000 x g para eliminar el buffer. Finalmente, el ADN purificado se disolvió en 50 µL agua o buffer EB (Elution Buffer) en un tubo limpio y se colocó en un instrumento *SpeedVac* (Thermo Scientific™ Savant SpeedVac™ ADN130) con el objetivo de concentrar la muestra al vacío.

3.7 [Digestión enzimática](#)

La digestión con las enzimas de restricción se realizó tanto sobre el plásmido pET-15b, como sobre el inserto que se había obtenido en la PCR (amplicón de ClpB). Para realizar este proceso, se utilizaron las enzimas *XbaI* y *NdeI*, previamente mencionadas en el apartado del diseño de primers. Con estas enzimas se generaron extremos cohesivos, a través de los cuáles puede integrarse el inserto dentro de la secuencia del plásmido de manera dirigida. Para ello, se incubó a 37°C una reacción que contenía un volumen total por tubo de 35µL:

Tabla 5. Componentes para la preparación de la digestión enzimática.

Reactivos	<i>E. coli</i>	<i>B. uniformis</i>	Plásmido pET-15b
Agua	18.5 µL	14.5 µL	23.5 µL
Enzima <i>XbaI</i>	1 µL	1 µL	1 µL
Enzima <i>NdeI</i>	1 µL	1 µL	1 µL

ADN	11 μL de amplicón de ClpB (725 ng)	15 μL de amplicón de ClpB (582ng)	6 μL (183ng)
Buffer	3.5 μL	3.5 μL	3.5 μL

La reacción de digestión se detuvo incubando los tubos con la mezcla a una temperatura de 85°C durante 15 min. Para purificar el material genético digerido, se añadieron 25 μL de perlas magnéticas (Beckman Coulter) en cada uno de los tubos (tanto los que contenían amplicón digerido como los que contenían plásmido digerido). Se mezclaron las soluciones por inversión de manera continuada durante 5 minutos y posteriormente se colocaron los tubos en una gradilla magnética. Dicha gradilla atrajo las perlas magnéticas de carga positiva a las que deben estar pegadas los fragmentos de ADN de la disolución, tanto el amplicón de ClpB como el plásmido. Se retiró el sobrenadante, y se realizó un lavado con etanol al 70%, por último, para desprender el ADN de las perlas magnéticas; se añadieron 20 μL de agua, se mezcló con el pellet que contenía las perlas magnéticas, y se incubaron los tubos en un termobloque previamente calentado a 37°C a 1000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se recuperó el sobrenadante en el que estaba disuelto el ADN. Los productos de la digestión fueron analizados posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa y cuantificados mediante el instrumento *Qubit 4.0*; para confirmar la eficacia del proceso.

3.8 [Protocolo de ligación](#)

A la hora de hacer la ligación (integrar el amplicón del gen ClpB en el plásmido pET-15b), se realizó una incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente de la siguiente mezcla con un volumen total de 20 μL .

Tabla 6. Componentes para la preparación de la ligación

Reactivos	<i>Bacteroides uniformis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Agua	1.5 μL	12.5 μL
Tampón ligasa	2 μL	2 μL
Amplicón (ClpB)	15 μL (16.8 ng)	4 μL (28.4ng)
Plásmido	0.5 μL (3.7ng)	0.5 μL (3.7 ng)
Enzimas de ligación (Ligasa T4)	1 μL	1 μL

Por último, se incubó dicha solución 10 minutos a 65°C para inactivar las enzimas ligasas T4 y continuar con el proceso.

3.9 Transformación bacteriana

Para realizar la transformación, primero se incubaron las células competentes (apartado 3.3) en hielo. Se añadieron 20 µL de la solución que contenía el plásmido con el inserto de ClpB al tubo de células competentes (50-100 µL), *E. coli* DH5-α, y se mezcló el contenido, dejándolo en incubación en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó un proceso de choque térmico a 42°C durante 2 minutos en el termobloque, y se volvió a incubar en hielo 10 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 900 µL de LB estéril al tubo, se mezcló la solución por inversión y se incubó 45 min a 37°C con agitación a 1000 rpm en un termobloque previamente calentado. Transcurrido el tiempo, se centrifugó la mezcla a 5000 x g, 10 minutos y se eliminó el sobrenadante dejando únicamente 100 µL de medio LB y el pellet celular. Se resuspendió el pellet en el medio sobrante, y se sembró en una placa de medio LB con ampicilina, para la cual tiene resistencia el plásmido pET-15b. La placa se cultivó toda la noche a 37°C en una estufa.

Al día siguiente, se comprobó que hubieran crecido colonias de *E. coli* DH5-α durante la noche y se sembraron de nuevo mediante estrías en placas de LB con ampicilina. Una vez realizado la expansión clonal en placa de las colonias obtenidas, se realizó el método de aislamiento del ADN mediante fenol-cloroformo. Para ello, se recuperó con un asa, la estría obtenida y se resuspendió en 25 µL de buffer de lisis (Tabla 7), posteriormente se añadieron 25 µL de fenol-cloroformo y se agitaron los tubos en un vórtex durante 20 segundos para que interaccionaran ambas fases. Posteriormente, se realizó una fase de centrifugación a 16.000 x g durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo estéril, fase que contiene el material genético de las bacterias y dónde debe estar el plásmido con el inserto. Finalmente, se realizó una electroforesis como se ha explicado anteriormente (apartado 3.5) y se estudiaron las bandas con el objetivo de comprobar si el plásmido recuperado tenía un patrón de migración diferente como consecuencia de la inserción del amplicón.

Tabla 7. Preparación del buffer de lisis:

Reactivo	Volumen
Tris pH 8 2mM	200 µL

EDTA pH8 2mM	10 mL
NaCl	1 mL
ARNasa	5 μ L

3.10 Protocolo de purificación de plásmidos

Los kits *NZYMiniprep* están diseñados para la obtención rápida y a pequeña escala de ADN plasmídico de gran pureza a partir de cepas recombinantes de *Escherichia coli*. El procedimiento se basa en la lisis alcalina de células bacterianas, seguida de la adsorción de ADN en sílice en presencia de altas concentraciones de sal. El ADN plasmídico se adsorbe selectivamente en la columna de centrifugación de plásmidos *NZYTech* basada en gel de sílice y se lavan otras impurezas como proteínas, sales, nucleótidos y oligos (<40-mer).

Para utilizar el kit, previamente se preparó 10 mL de medio LB con 10 μ L de ampicilina y una colonia de la bacteria transformada con el plásmido pET-15b con el inserto de ClpB incubando durante la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, se distribuyó la disolución en cuatro tubos de 2 mL. Se realizó una primera centrifugación a 5000 x g durante 10 minutos, para separar las bacterias del medio. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en buffer A1. Posteriormente, se añadieron 250 μ L de buffer A2 y se invirtieron los tubos varias veces, seguidos de una incubación de no más de 4 minutos. Seguidamente, se adicionaron 300 μ L de buffer A3 y tras mezclarlo, se realizó una centrifugación a 5000 x g de 7 minutos. Se transfirió el sobrenadante resultante a columnas de sílice y se realizó una centrifugación rápida de 1 minuto a 11.000 x g, tras la cual se descartó el sobrenadante. Se añadieron 500 μ L de buffer AY a la columna, esencial para eliminar completamente las endonucleasas, y se centrifugó a 5000 x g durante 1 minuto, eliminando posteriormente el sobrenadante. Se añadieron 600 μ L de buffer A4 y se centrifugó en las mismas condiciones eliminando nuevamente el sobrenadante. Para terminar, se realizó una nueva centrifugación, esta vez de 2 minutos con los tubos vacíos, y finalmente se incubó el tubo 1 minuto con buffer AE y se volvió a centrifugar 1 minuto a 5000 x g.

El tubo resultante se llevó al concentrador al vacío: Thermo Scientific™ Savant *SpeedVac*™ ADN130 durante una hora, donde se concentró más el contenido, y finalmente se envió a secuenciar para comprobar que en el plásmido pET-15b se había integrado correctamente el inserto del gen ClpB, con la secuencia completa.

3.11 Prueba de sobreexpresión de la proteína ClpB

Con el objetivo de conseguir una gran concentración de proteínas ClpB, se prepararon dos medios en matraces de 100 mL: 50 mL de medio LB y 50 mL de medio LB autoinducido.

Posteriormente se dividió el contenido de cada uno de los matraces en dos matraces nuevos de menor tamaño, para estudiar tanto la proteína ClpB de *E. coli* como la de *B. uniformis* en las dos condiciones. A estos 4 matraces se les añadió 20 mL de medio (LB o LB autoinducido) y 20 μ L de Ampicilina (para limitar el crecimiento a las bacterias que tuvieran el plásmido pET-15b con el inserto de ClpB) y se llevaron a la estufa para que su temperatura oscilara los 37°C.

Mientras se atemperaban los matraces con el medio, se procedió a realizar el proceso de transformación de nuevo, pero esta vez, con bacterias *E. coli* BL21-DE3 y con 95 ng/ μ L de plásmido pET-15b con el inserto de ClpB; tanto de *E. coli* como de *B. uniformis*. El resto del procedimiento se explica en el apartado 3.9. Finalmente, en vez de sembrar las bacterias en placas, se sembraron en los 4 matraces con medio que se habían preparado con anterioridad y se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación a 150rpm.

Al día siguiente, se retiró el cultivo del incubador y se dejó enfriar en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se dividió cada matraz en dos tubos de 2 mL y se centrifugaron a 3500 x g, 20 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300 μ L de PBS. Posteriormente, se juntaron los dos tubos iguales de cada condición de cultivo, en un tubo especial que contenía perlas de zirconio con un diámetro de 0.1mm (Silica Beads, BioSpec Products, cat#110791017). Gracias a estas perlas se realizó una lisis mecánica en el homogeneizador FastPrep-24™ 5G, que se programó para hacer 4 ciclos de 30 segundos a 6m/sec. Además, también se añadió a cada uno de los tubos 2 μ L de cóctel de lisis para realizar una segunda lisis celular, esta vez química. Este preparado está compuesto por lisozima (50ug/ μ L) y mutanolisina (1U/ μ L). Una vez terminaron los ciclos de homogeneización, se centrifugaron los tubos a 12.000 x g, 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante donde estaban disueltas las proteínas y se cuantificaron en el *Qubit 4.0*, con el kit comercial *Broad Range Protein Assay*. En esta ocasión al no tratarse de material genético, se procedió de manera distinta a la explicada anteriormente:

Primero se preparó una solución compuesta por 199 μ L de *protein buffer* y 1 μ L del fluoróforo por cada muestra que había que cuantificar, en este caso, 4 (796 μ L de *protein buffer* y 4 μ L de fluoróforo). Después, se añadió a un tubo 199 μ L de esta solución y 1 μ L de cada una de las muestras a analizar. Los resultados se obtuvieron en ng/ μ L.

3.11.1 [Electroforesis en condiciones desnaturalizantes \(SDS-PAGE\)](#)

Paralelamente al método anterior y para determinar si las muestras contenían la proteína ClpB, se preparó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El SDS es el reactivo que va a desnaturalizar la proteína, confiriéndole carga negativa y permitiendo así su migración a lo largo del gel.

Para empezar con el proceso, se preparó en primer lugar el gel separador al 10% de poliacrilamida (1.5M, pH 8.8), acrilamida (40%, 29:1), SDS (10%), APS (10%) y TEMED.

Tabla 8. Reactivos y volúmenes del gel separador:

Reactivos	Volumen
Agua MiliQ	4.8 mL
Tris-HCl (1.5M, pH 8.8)	2.5 mL
Acrilamida (40%, 29:1)	2.5 mL
SDS (10%)	100 µL
APS (Persulfato de amonio)	100 µL
TEMED	10 µL

Una vez esta primera fase del gel polimerizó, se preparó el gel concentrador al 4% de poliacrilamida (Tris-HCl 0.5M, pH 6.8), acrilamida (40%, 29:1), SDS (10%), APS (10%) y TEMED:

Tabla 9. Reactivos y volúmenes del gel concentrador:

Reactivos	Volumen
Agua MiliQ	2.5 mL
Tris-HCl (1.5M, pH 8.8)	1 mL
Acrilamida (40%, 29:1)	0.4 mL
SDS (10%)	40 µL
APS (Persulfato de amonio)	40 µL
TEMED	4 µL

Como se conocía la concentración proteica de cada muestra, se cargaron 20 µL de la preparación (20 µg de proteína, 4 µL de *Sample Loading Buffer* 5X y agua hasta completar los 20 µL) en los pocillos de la electroforesis. Además, en uno de los extremos, se cargó el

marcador de peso molecular (5 μ L) *NZYBlue Protein Marker* y se programó la electroforesis a 35 mA constante, durante 1 hora a 300 V. Posteriormente, al finalizar la migración proteica, se realizó una tinción con *Coomassie Blue* durante 1 hora, y para finalizar, se destiñó el gel con una serie de lavados con *destain solution*, con el objetivo de retirar el exceso del colorante azul.

3.12 Sobreexpresión y purificación de proteínas

DÍA 1

El primer día en la realización de este experimento, se preparó 1 litro de medio LB de autoinducción, *NZY Auto-Induction LB medium (powder)*, se esterilizó, y posteriormente, se le añadieron 10 mL de glicerol. El medio se incubó toda la noche a 150 rpm a 37°C.

DÍA 2

A la mañana siguiente, se recogió el matraz de la incubadora y se le añadió 1mL de ampicilina. Posteriormente, se dividió el contenido en dos matraces de 500 mL y se dejaron a 37°C.

Paralelamente, se escogieron células *E. coli* BL21-DE3 competentes y se les añadió el plásmido pET-15b con el inserto de ClpB tanto de *E. coli* como de *B. uniformis* (1 μ L). Se realizó el protocolo de transformación tal y como se explica en el punto 3.9. Y finalmente se inocularon los matraces de 500 mL con el resultado de la transformación (bacterias BL21-DE3 con el plásmido) y se dejaron incubando a 37°C y 150 rpm toda la noche.

DÍA 3

Al día siguiente se recogieron los matraces y se incubaron en botellas de centrifuga de 1L en hielo durante 20 minutos. Pasado el tiempo, se centrifugó a 4°C, 5000 x g y 25 minutos. Se prepararon 20 mL de TBS 1X a pH 8 por botella y se utilizó para resuspender el pellet resultante de la centrifugación. Se transfirió la mezcla resultante a tubos de 15 mL estériles y se centrifugaron a 2500 x g durante 20 minutos a 4°C.

Una vez terminó la centrifugación, se volvió a resuspender el pellet en TBS 1X a pH 8 (15 mL/botella). Se añadieron 200 μ L de beads de zirconio con un diámetro de 0.1 mm (Silica Beads, BioSpec Products, cat#110791017) para romper las células de manera mecánica y 10 μ L de cóctel de lisis (lisozima y mutanolisina) y se dio un vórtex 1 minuto. Por último, se preparó un

homogeneizado para el *FastPrep-24™ 5G* de acuerdo con los protocolos requeridos para la disrupción bacteriana (4 ciclos de 30 segundos a 6 m/s). Este homogeneizado se transfirió a tubos de 50 mL y se centrifugaron a 16000 x g durante 20 minutos a 4°C. Por último, se incubó el sobrenadante resultante hasta el día siguiente.

DÍA 4

Para purificar la proteína, se utilizaron columnas cromatográficas *TALON metal affinity resin* (Takara). Para ello se prepararon 40mL de TBS 1X a pH 8 por muestra a analizar, en este caso dos: la proteína ClpB de *Bacteroides uniformis* y la de *Escherichia coli*. A partir de los 40 mL se hicieron dos lavados por columna (de 20 mL). Seguidamente, se transfirió el sobrenadante resultante del día anterior a las columnas y se dejaron en agitación en el agitador rotatorio noria durante 2 horas, en la sala fría a 4°C.

Paralelamente se prepararon los tampones de lavado y de elución:

Tabla 10. Elaboración del tampón de lavado

Reactivos	Concentración Stock	Concentración final	Volumen
TBS pH 8	10X	1X	40 mL
Tritón X-100	100%	0.1%	400 µL
Imidazol	2 M	5 mM	2 mL
Agua MiliQ	-	-	358 mL

Tabla 11. Elaboración del tampón de elución

Reactivos	Concentración Stock	Concentración final	Volumen
TBS pH 8	10X	1X	4 mL
Imidazol	2 M	150 mM	3 mL
Agua MiliQ			33 mL

Pasadas 2 horas, se sacaron las columnas del agitador noria, y se colocaron en soportes. Se les quitó la punta protectora de plástico y el tapón, y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se realizaron 10 lavados con el tampón de lavado y con la ayuda de una pipeta Pasteur se mezcló el tampón con la resina de la columna cromatográfica. El sobrenadante se desechó.

Finalmente, cuando se realizó el décimo lavado se procedió a eluir la muestra, para ello, se hizo pasar 2mL del tampón de elución aproximadamente cada 10 minutos para recuperar el eluido donde se encontraba la proteína. Este proceso se realizó a 4°C. Se transfirió el contenido rico en proteínas a tubos *Falcon* de 50mL y estos se incubaron en hielo durante toda la noche.

DÍA 5

Se invirtieron los *Falcon* varias veces para homogeneizar el contenido, y con el objetivo de concentrarlo, se pasó el eluido proteico a *Falcon* de 50mL con filtros *Amicon* (50 kDa) y se centrifugó a 2500 x g, 10 minutos a 4°C. Este proceso se repitió hasta que el volumen se redujo a 500 µL.

Posteriormente, se pasó el contenido residente en el filtro, a tubos de 1.5 mL con filtros *Amicon* (50 kDa) y se centrifugó en las mismas condiciones hasta que se obtuvo un volumen menor de 100 µL.

Se cuantificó la cantidad de proteína como se especifica en el apartado 3.11 con ayuda del *Qubit 4.0*. Los resultados se obtuvieron en ng/µL. Después, se preparó un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS) y se analizó la proteína ClpB purificada.

3.13 Análisis de la actividad enzimática de ClpB

Una vez la proteína ClpB de *E. coli* y *B. uniformis* previamente sobreexpresada se purificó, se procedió a la realización de un ensayo enzimático para comprobar que dicha proteína mantenía su actividad original, ATPasa.

En primer lugar, se preparó una solución proteica a 0.01µM en tampón de ensayo 1X.

Tabla 12. Elaboración de Tampón de ensayo 5X:

Reactivos	Tris-HCl pH 7.5	MgCl ₂	KCl	Glicerol
Cantidad	10 mL (250mM)	0.038 g (10mM)	0.756 g (250mM)	10 mL 25% (v/v)

Posteriormente, se preparó una placa de 96 multipocillos de fondo plano transparente y se colocó en el hielo. En las dos primeras columnas (de las posiciones 1A a 2H) se colocaron 50 µL de estándares de fosfato por duplicado.

Los estándares de fosfato se realizaron del siguiente modo:

Estándar 1 = 500 μM (25 μM de K_2HPO_4 10mM + 375 μL Milli-Q + 100 μL 5X buffer de ensayo)
 Estándar 2 = 250 μM (250 μM de Estándar 1 + 150 μL Milli-Q + 100 μL 5X buffer de ensayo)
 Estándar 3 = 125 μM (250 μM de Estándar 2 + 150 μL Milli-Q + 100 μL 5X buffer de ensayo)
 Estándar 4 = 62.5 μM (250 μM de Estándar 3 + 150 μL Milli-Q + 100 μL 5X buffer de ensayo)
 Estándar 5 = 31.3 μM (250 μM de Estándar 4 + 150 μL Milli-Q + 100 μL 5X buffer de ensayo)
 Estándar 6 = 15.6 μM (250 μM de Estándar 6 + 150 μL Milli-Q + 100 μL 5X buffer de ensayo)
 Estándar 7 = 7.8 μM (250 μM de Estándar 1 + 150 μL Milli-Q + 100 μL 5X buffer de ensayo)
 Estándar 8 = 0 μM (400 μL Milli-Q + 100 μL 5X buffer de ensayo)

Después, se colocaron 2 μL de seis soluciones decrecientes de ATP por cuadruplicado para las bacterias *E. coli* y *B. uniformis*.

Tabla 13. Elaboración de soluciones de ATP

Soluciones de ATP	Stock	Concentración final
ATP 1	25 mM	1mM
ATP 2	12.5 mM	0.5 mM
ATP 3	6.25 mM	0.25 mM
ATP 4	3.13 mM	0.125 mM
ATP 5	1.56 mM	0.063mM
ATP 6	0 mM	0 mM

Se añadieron 50 μL de la solución proteica de ClpB a cada uno de los pocillos que contenían soluciones de ATP. Después, se incubó la placa multipocillo a 37 °C durante 10 minutos.

Pasado ese tiempo, se añadieron 150 μL de la solución: “preparado de malaquita”, a cada uno de los pocillos con contenido de la placa. Para la preparación de esta mezcla, se utilizaron 4 mL de agua milli-Q, 4 mL de verde malaquita (0.11% w/v), 2 mL de molibdato de amonio y 2 mL de polivinil alcohol (0.35g en 15 mL de agua Milli-Q). Se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos y, finalmente se midió la absorbancia a 690nm en un espectrofotómetro.

4 [Resultados](#)

4.1 [Generación de los amplicones](#)

Para comprobar que la generación de los amplicones derivados de la PCR había sido exitosa, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para analizar el tamaño de estos fragmentos (Fig. 5), comparándolos con el tamaño esperado de los genes clonados.

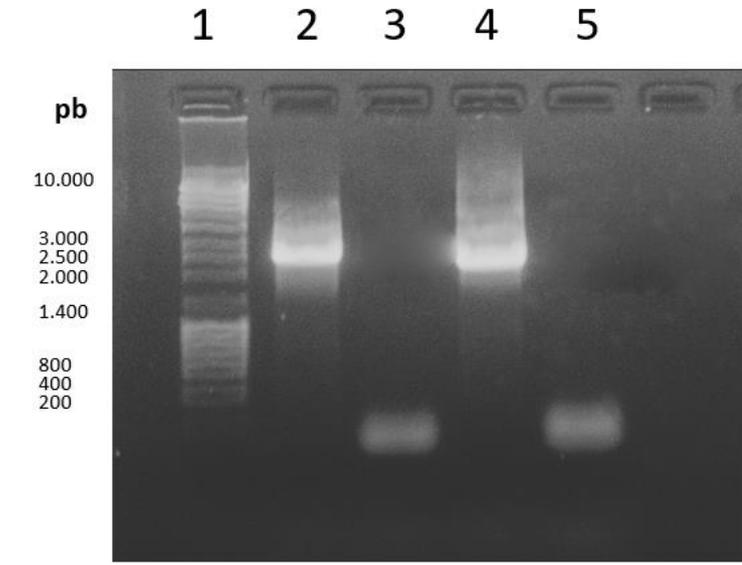


Figura 4. Generación de amplicones del gen ClpB. Se muestra un gel de agarosa en el que se observa (1) el marcador de peso molecular, (2) el gen de ClpB amplificado correspondiente a *B. uniformis*, (3) un control negativo sin el ADN de *B. uniformis*, (4) el gen de ClpB amplificado correspondiente a *E. coli* y (5) un control negativo sin el ADN de *E. coli*.

La secuencia de referencia de *Bacteroides uniformis* es:

```
>NZ_CP072255.1:2677888-2680482 Bacteroides uniformis CL03T12C37
chromosome, complete genome
ATGAACTTTAACAACCTTTACCATTAAAGCGCAAGAAGCAGTGCAGGAGGCTGTGAACCTGGTACAAAGCC
GTGGACAGCAGGCCATCGAGCCCGTGCATGTACTTCAAAGCGTGATGAAAGTAGGTGAAAATGTCACCAA
CTTCATCTTCCAGAAACTGGGCATGAACGGTCAGCAGATAGCACTTGTACTGGACAAGCAAATTGATTCT
CTGCCCAAGGTATCCGGCGGAGAGCCATACCTGAGCCGTGAAACGAACGAAGTGTTCAGAAAGGCCACCC
AATATTTCCAAGGAAATGGGTGATGAATTCGTCTCCCTGGAACCGGTACTGCTGGCTTTGCTGAATGTGAA
AAGCACTGCATCCACCATTCTGAAAGATGCCGGGATGACGGAACGCGAACTGCCGGAAGCCATCAACGAA
CTGCGAAAAAGGAGAAAAAAGTAACTTCACAAATCCAGCGAAGACACTTACCAGTCATTGGAAAAGTACGCTA
TCAATCTGAACGAAGCAGCCCGCAGCGGCAAACTGGATCCCCTCATCGGCCGTGACGAAGAGATACGGCG
TGTCTGCAGATTCTGAGCCGGCGTACCAAGAACAACCCGATTCCTTATCGGTGAACCGGGTACCGGTAAA
ACAGCTATCGTAGAGGGACTTGCCACCCTATCTTGGCGTGGAGACGTCCCCGAGAACTTGAAGAACAAC
AAGTCTACTCCCTGGATATGGGTGCACTGGTGGCGGGCGTAAATACAAAGGCGAATTTGAAGAAGCCT
GAAGCCGTTATCAACGAAGTGAAGAAGTCCGAAGGAGACATCATCCTCTTCATTGATGAAATCCACACC
CTGGTGGGTGCAGGCAAGGGCGAAGGCGCCATGGATGCCGCCAACATCCTGAAACCCGCCCTGGCAGCGG
GTGAACTGAGGAGCATCGGGGCCACTACCCTCGATGAATATCAGAAGTATTTGAAAAGGACAAAGCGTT
GGAGCGCCGCTTCCAGATTGTCATGGTGAACGAACCGGACACGCTGAGCACCATCTCCATTCTGCGTGGT
CTGAAGGAACGTTATGAGAACCATCACACGTACGGATTAAGGACGATGCCATCATCGCCGCCGTAGAGT
TGAGCAACCGTTACATCACCGACCGTTTCTTGGCCGACAAGGCTATCGACCTGATGGACGAAGCCGCCG
CAAGCTGCGTATGGAGGTCGATTCCGTACCGGAAGAGCTGGACGAGATTTCCGCGTAAGATAAAGCAGCTG
GAGATTGAACGTGAAGCCATCAAGCGGAAAAACGACAAGCCCAAACGGAAACAAATCGGCAAAGAAGTTG
CCGAGCTGAAAGAGCAGGAAAACTCGTACAAGGCGAAAATGGCAAAGTGAAGAAGACCCCTTGTCAACAAAAT
CCAGCAGAATAAGGTGAAAATAGAGAACCTGAAGTTCGAGGCCGACAAGGCTGAACGGGAAGGCCACTAT
```

GGCCGGGTGGCCGAAATACGCTACGGCAAACCTGCAAGCGCTGAACCAGGAGATTGAAGAAACGCAGCAAA
AACTGCACGAGATGCAGGGCGACAAGGCCATGATTAAGAGGAAGTGGACGCTGAAGACATCGCCGACGT
AGTATCCCCTGGACCAGGCATACCGGTAAGCAAGATGCTGCAAAGCGAAAAGGACAAACTGTTGCATCTG
GAGGCGGAACTGCACCAGCGGGTTATCGGGCAGGACGAAGCCATCGAGGCCGTATCCGATGCCGTACGAC
GCAGCCGTGCCGGACTGCAAGACCCGAAACGTCCATCGGCTCATTCCTTTTCTGGGAACCACCGGTGT
AGGTAAGACGGAATTGGCAAAGGCGCTGGCGGAGTTCCTCTTTGACGACGAGACAATGATGACCCGTATC
GACATGAGCGAGTATCAGGAGAAAACACAGCGTTTCCCGTCTGGTTGGAGCGCCTCCGGGATATGTGGGCT
ACGATGAAGGTGGACAACCTGACAGAAGCCGTAAGGCGGAAACCGTATCTGTCTGCTTATTCGACGAAAT
CGAGAAAGCGCATCCGGACTGATTAACATCTTGCTGCAAGTGCCTGGATGACGGACGCTGACGGGACAAC
AAAGGGCGTACGGTCAACTCAAGAATACGATTTATCATCATGACCTCCAACATGGGCAGCGGCTATATCC
AAAGCCAGATGGAGAAGCTCAACAGTAGCAATAAGGAGCAAATCGTAGAGGAAACAAAAAGGAAGTGAT
GAATATGCTGAAAAAGACCATCCGCCCGGAATTCCTGAACCGTATCGACGAGACCATCATGTTCCCTGCCA
CTGACAGAGCCCCGAAATCAAGCAAAATTTGGTGTCTCCAAATCAAGAGTGTGCAGAAGATGCTTTCCGGTA
ACGGTGTAGAACTTGTCTGACAAATGCTGCCATAGACTTCCCTGCCAATGCAGGGTATGACCCTGAATT
CGGCGCCCGTCCGGTGAAACGTGCCATCCAGCACTATTTGCTGAACGACTTGTGCAAGAAGCTGCTGGCT
CAGGAAGTAGACCGCAGCAAGCCTATTACAGTGGATGCCAATACCCTGACGACGGACTGGTTTTTCAGAA
ATTAA

La secuencia de referencia de *Escherichia coli* es:

>NC_000913.3:c2734173-2731600 **Escherichia coli** str. K-12 substr.
MG1655, complete genome
ATGCGTCTGGATCGTCTTACTAATAAAATTCAGCTTGCTCTTGCCGATGCCAATCACTTGCACCTCGGGC
ACGACAACCAATTTATCGAACCACCTTCATTTAATGAGCGCCCTGCTGAATCAGGAAGGGGGTTTCGGTTAG
TCCTTTTATTAACATCCGCTGGCATAAATGCTGGCCAGTTGCGCACAGATATCAATCAGGCATTAATTCGT
TTACCGCAGGTTGAAGGTACTGGTGGTGATGTCCAGCCATCACAGGATCTGGTGGCGGTTCTTAATCTTT
GCGACAAGCTGGCGCAAAAACTGGTGATAACTTTATCTCGTCAGAACTGTTCTGTTCTGGCGGCACCTGA
GTCTCGCGGCACGCTGGCCGACATCCTGAAAGCAGCAGGGGCGACCACCGCCAACATTACTCAAGCGATT
GAACAAATGCGTGGAGGTGAAAGCGTGAACGATCAAGGTGCTGAAGACCAACGTCAGGCTTTGAAAAAT
ATACCATCGACCTTACCGAACGAGCCGAACAGGGCAAACCTCGATCCGGTGATTTGGTCTGATGAAGAAAT
TCGCCGTACCATTAGGTGCTGCAACGTCGTAATAAAAAAACCCTGGTACTGATTTGGTGAACCCGGCGTC
GGTAAAACCTGCCATCGTTGAAGGTCTGGCGCAGCGTATTATCAACGGCGAAGTCCCGGAAGGGTTGAAAG
GCCGCCGGGTACTGGCGCTGGATATGGGCGCGCTGGTGGCTGGGGCGAAATATCGCGGTGAGTTTGAAGA
ACGTTTAAAAGGCGTGCTTAACGATCTTGCCAAACAGGAAGCAACGTCATCCTATTTATCGACGAATTA
CATACCATGGTTCGGCGCGGGTAAAAGCCGATGGCGCAATGGACGCCGGAACATGCTGAAACCGGCGCTGG
CGCGTGGTGAATTCGACTGCGTAGGTGCCACGACGCTTGACGAATATCGCCAGTACATTTGAAAAAGATGC
TGCGCTGGAACGTCGTTTCCAGAAAAGTGTGTTGTTGCCGAGCCTTCTGTTGAAGATACCATTGCGATTCTG
CGTGGCCTGAAAGAACGTTACGAATTCACCACCATGTGCAAATTAAGTACCCGGCAATTTGTTGCAGCGG
CGACGTTGTCTCATCGCTACATTTGCTGACCGTCAGCTGCCGGATAAAGCCATCGACCTGATCGATGAAGC
AGCATCCAGCATTCGATGACGATGACTCAAAACCAGAAGAATCGACCGACTCGATCGTCTGATCATC
CAGCTCAAACCTGGAACAACAGGCGTTAATGAAAGACTCTGATGAAGCCAGTAAAAAACGCTGGATAATGC
TCAACGAAGAAGTACGCGACAAAGAAGCTCAGTACTCCGAGTTAGAAGAAGAGTGGAAAGCAGGATAAGGC
ATCGCTTTCTGGTACGACGACCATTAAGCGGAACCTGGAACAGGCGAAAATCGCTATTGAACAGGCTCGC
CGTGTGGGGGACCTGGCGCGGATGCTGAACTGCAATACGGCAAATCCCGGAACCTGGAAAAGCAACTGG
AAGCCGCAACGCAGCTCGAAGGCAAAACTATGCGTCTGTTGCGTAATAAAGTGACCGACGCCGAAATTCG
TGAAGTGTGGCGGTTGGACGGGGATTCCGGTTTCTCGCATGATGGAAAGCGAGCGGAAAACCTGCTG
CGTATGGAGCAAGAAGTGCACCATCGCGTAATTTGGTTCAGAACGAAGCGGTTGATGCGGTATCTAACGCTA
TTCGTCGTAGCCGTGCGGGGCTGGCGGATCCAAATCGCCGATTTGGTTTCATTCCTGTTCCCTCGGCCAAC
TGGTGTGGGGAAAACAGAGCTTTGTAAGGCGCTGGCGAACTTTATGTTTGATAGCGACGAGGCGATGGTC
CGTATCGATATGTCGAGTTTATGGAGAAACACTCGGTGCTCGTTTGGTTGGTGGCGCTCCGGGATATG
TCGGTTATGAAGAAGGTGGCTACCTGACCGAAGCGGTGCGTCTGTCGTCCTGATTCCTGCTGGA
TGAAGTGGAAAAAGCGCATCCGGATGCTTCAACATTTCTGTTGCAGGTACTGGATGATGGGCGTCTGACT
GACGGGCAAGGGGAGAACGGTTCGACTTCCGTAATACGGTCTGCTATTATGACCTCTAACCTCGGTTCCGATC
TGATTCAGGAACGCTTCGGTGAACCTGGATTATGCGCACATGAAAGAGCTGGTGTCTCGGTGTGGTAAGCCA
TAACTTCCGTCCGGAATTCATTAACCGTATCGATGAAGTGGTGGTCTTCCATCCGCTGGGTGAACAGCAC
ATTGCTTCGATTCGCGCAGATTCAGTTGAAACGCTGTACAAACGCTCGGAAGAAGCTGGTTATGAAATCC
ACATTTCTGACGAGGCGCTGAAACTGCTGAGCGAGAACGGTTACGATCCGGTCTATGGTGCACGTCCTCT
GAAACGTGCAATTCAGCAGCAGATCGAAAACCCGCTGGCACAGCAAATACTGTCTGGTGAATTTGGTTCCG
GGTAAAGTGATTCGCTTGAAGTTAATGAAGACCGGATTTGTCGCCGTCCAGTAA

Como se puede observar, el tamaño de los fragmentos obtenidos en los carriles 2 y 4 (Fig. 5) se corresponde con el tamaño esperado al compararlo con los fragmentos teóricos de los genes clonados; de alrededor de 2600 en el caso de *B. uniformis* (2596pb) y alrededor de 2500pb en el caso del gen ClpB de *E. coli* (2574pb).

4.2 Transformación de bacterias DH5- α con el plásmido pET-15b y el inserto de ClpB

Para evaluar si el proceso de transformación de las células competentes *E. coli* DH5- α con el plásmido pET-15b y el inserto del gen ClpB había sido exitoso, se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

En la figura 5, se observan las bandas correspondientes al ADN extraído de las bacterias DH5- α con un tamaño uniforme de aproximadamente 10.000 kb, correspondiente al ADN genómico bacteriano. Todas las bandas presentan una intensidad relativamente semejante, pero la que es realmente interesante en este caso, es la banda inferior de cada carril, de una menor intensidad, ya que es la que indica la presencia o no del gen ClpB dentro del plásmido pET-15b. En los casos en que esta banda secundaria presenta un mayor tamaño, se puede presuponer que la bacteria ha incorporado el constructo pET-15b + gen de ClpB (En el gel A, el carril 5 y en el gel B, los carriles 4 y 11), en comparación con aquellos casos en que la banda secundaria sea de menor tamaño porque se tratará de bacterias que únicamente habrán incorporado el plásmido vacío. La banda superior presente en todos los carriles se corresponde como ya se ha indicado, con ADN genómico de un tamaño mayor que el plásmido.

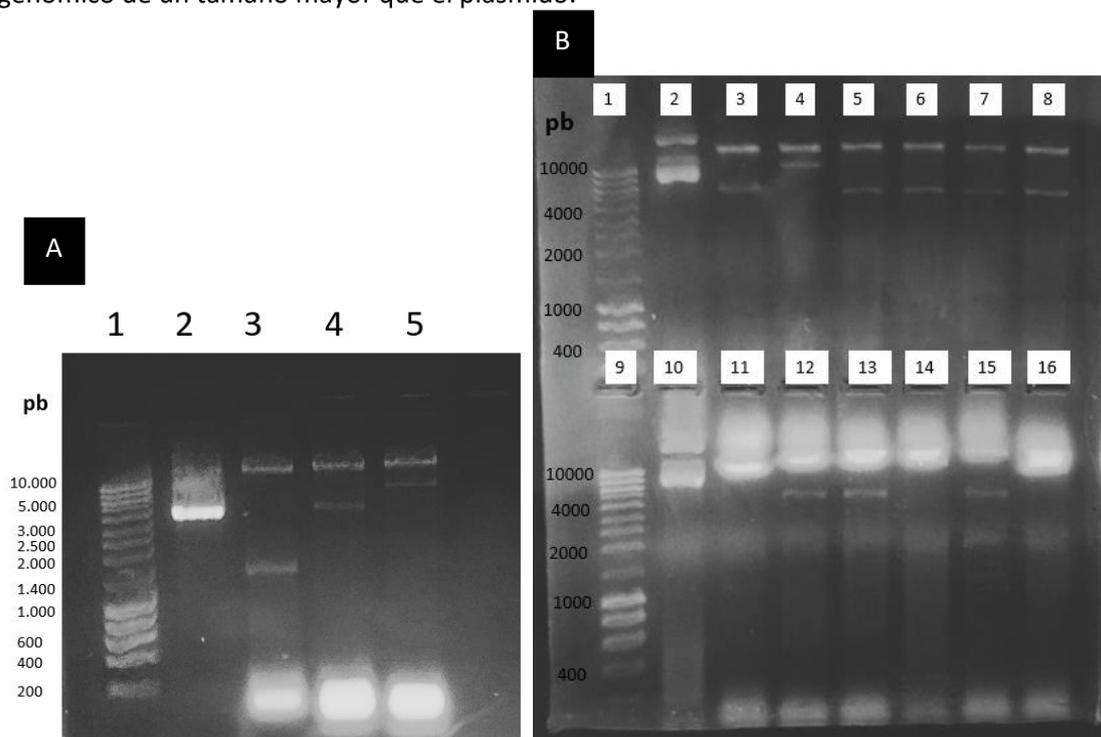


Figura 5. Transformación de bacterias *E. coli* DH5- α . Se muestran dos geles de agarosa cargados con el material genético de las bacterias, incluidos los plásmidos pET-15b con o sin el inserto del gen ClpB. El gel **A** se corresponde con bacterias DH5- α transformadas con el inserto de ClpB de *b. uniformis*. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra el plásmido pET-15b vacío, y en los carriles 3-5 se muestra el resultado de la transformación bacteriana de 3 colonias. El gel **B** se corresponde con bacterias DH5- α transformadas con el inserto de ClpB de *E.coli*. En los carriles 1 y 9 se encuentra el marcador de peso molecular, en los carriles 2 y 10 está el plásmido pET-15b vacío a modo de control y en los carriles del 3-8 y 11-16 se muestra el resultado de la transformación bacteriana de 12 colonias.

Posteriormente, para verificar que han incorporado la construcción del plásmido con el inserto de ClpB, se realizó una *MiniPrep* a partir de la cual se obtuvo el ADN plasmídico purificado de las bacterias y se envió a secuenciar.

4.3 [Secuenciación de la construcción del plásmido pET-15b con el inserto del gen ClpB](#)

Con el objetivo de comprobar que el inserto del gen ClpB se había integrado correctamente en el plásmido pET-15b, se realizó una secuenciación para analizar si, además, la secuencia del gen estaba completa y que sería capaz de traducirse a la proteína ClpB íntegra gracias a la maquinaria de las bacterias *E. coli* BL21-DE3 posteriormente.

Para ello, una vez obtenida la secuenciación de Sanger correspondiente a la secuencia de la construcción pET-15b + ClpB, se realizó un BLAST en el que se compararon mediante un alineamiento, la secuencia obtenida y la secuencia de ClpB de la que se partió a la hora de hacer la clonación (Apartado 4.1). Se obtuvieron los siguientes resultados:

A	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Secuencia gen E.coli		1181	1181	93%	0.0	99.84%	2574	Query_79783

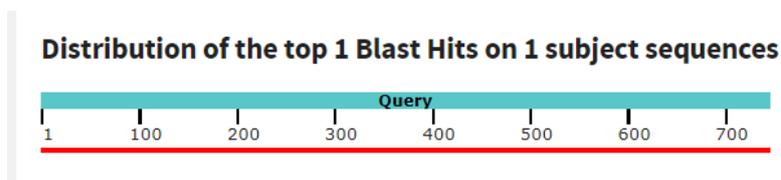
Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences



		Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
		1181 bits(639)	0.0	641/642(99%)	0/642(0%)	Plus/Plus
Query	47	ATGCGTCTGGATCGTCTTACTAATAAATCCAGCTTGCTCTTGCCGATGCCCAATCACTT				106
Sbjct	1	ATGCGTCTGGATCGTCTTACTAATAAATCCAGCTTGCTCTTGCCGATGCCCAATCACTT				60
Query	107	GCACTCGGGCAGCACAAACCAATTTATCGAACCACTTCATTTAATGAGCGCCCTGCTGAAT				166
Sbjct	61	GCACTCGGGCAGCACAAACCAATTTATCGAACCACTTCATTTAATGAGCGCCCTGCTGAAT				120
Query	167	CAGGAAGGGGGTTCGGTTAGTCCTTTATTAACATCCGCTGGCATAAATGCTGGCCAGTTG				226
Sbjct	121	CAGGAAGGGGGTTCGGTTAGTCCTTTATTAACATCCGCTGGCATAAATGCTGGCCAGTTG				180
Query	227	CGCACAGATATCAATCAGGCATTAATCGTTTACCGCAGGTTGAAGGACTGGTGGTGAT				286
Sbjct	181	CGCACAGATATCAATCAGGCATTAATCGTTTACCGCAGGTTGAAGGACTGGTGGTGAT				240
Query	287	GTCCAGCCATCACAGGATCTGGTGC GCGTTCTTAATCTTTGCGACAAGCTGGCGCAAAA				346
Sbjct	241	GTCCAGCCATCACAGGATCTGGTGC GCGTTCTTAATCTTTGCGACAAGCTGGCGCAAAA				300
Query	347	CGTGGTGATAACTTTATCTCGTCAGAACTGTTTCGTTCTAGCGGCACCTTGAGTCTCGCGC				406
Sbjct	301	CGTGGTGATAACTTTATCTCGTCAGAACTGTTTCGTTCTAGCGGCACCTTGAGTCTCGCGC				360
Query	407	ACGCTGGCCGACATCCTGAAAGCAGCAGGGGCGACCACCGCCAACATTACTCAAGCGATT				466
Sbjct	361	ACGCTGGCCGACATCCTGAAAGCAGCAGGGGCGACCACCGCCAACATTACTCAAGCGATT				420
Query	467	GAACAAATGCGTGGAGGTGAAAGCGTGAACGATCAAGGTGCTGAAGACCAACGTCAGGCT				526
Sbjct	421	GAACAAATGCGTGGAGGTGAAAGCGTGAACGATCAAGGTGCTGAAGACCAACGTCAGGCT				480
Query	527	TTGAAAAATATACCATCGACCTTACCGAACGAGCCGAACAGGGCAAACCTCGATCCGGTG				586
Sbjct	481	TTGAAAAATATACCATCGACCTTACCGAACGAGCCGAACAGGGCAAACCTCGATCCGGTG				540
Query	587	ATTGGTCGTGATGAAGAAATTCGCCGTACCATTAGGTGCTGCAACGTCGACTAAAAAT				646
Sbjct	541	ATTGGTCGTGATGAAGAAATTCGCCGTACCATTAGGTGCTGCAACGTCGACTAAAAAT				600
Query	647	AACCCGGTACTGATTGGTGAACCCGGCGTCGGTAAAAC TGCC				688
Sbjct	601	AACCCGGTACTGATTGGTGAACCCGGCGTCGGTAAAAC TGCC				642

Figura 6. Secuenciación del plásmido pET-15b con el inserto de ClpB de *E. coli* (Forward). En (A) se muestra una cobertura del 93% y un porcentaje de identidad del 99.84% en la primera parte del gen ClpB de la bacteria *Escherichia coli*. En (B) se hace una comparativa entre la secuencia del plásmido pET-15b con el inserto de ClpB (Query) y el gen de ClpB de *E. coli* (Sbjct). Se observa una identidad de secuencia del 99%, y un único cambio de nucleótido de purina a purina en el alineamiento correspondiente a la primera parte del gen.

A		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Secuencia gen E.coli		1356	1356	100%	0.0	99.86%	2574	Query_33889



B

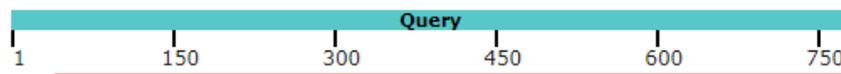
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1356 bits(734)	0.0	736/737(99%)	0/737(0%)	Plus/Minus
Query 1	TTCATTAAC	TTCAGGCGAATCAC	TTTACCCGGAACCAATT	CACCAGACAGTATTTGCTG 60
Sbjct 2550	TTCATTAAC	TTCAGGCGAATCAC	TTTACCCGGAACCAATT	CACCAGACAGTATTTGCTG 2491
Query 61	TGCCAGCGGG	TTTTCGATCTGCTGCT	GAATTGCACGTTTCAGAGGACGT	GCACCATAGAC 120
Sbjct 2490	TGCCAGCGGG	TTTTCGATCTGCTGCT	GAATTGCACGTTTCAGAGGACGT	GCACCATAGAC 2431
Query 121	CGGATCGTAAC	CGTTCTCGCTCAGCAG	TTTCAGCGCCTCGTCAGAAAT	GTGGATTTTCATA 180
Sbjct 2430	CGGATCGTAAC	CGTTCTCGCTCAGCAG	TTTCAGCGCCTCGTCAGAAAT	GTGGATTTTCATA 2371
Query 181	ACCACGTTCTT	CCAGACGTTTGTACAG	AGCTTCAACTGAATCTGCGCAAT	CGAGGCAAT 240
Sbjct 2370	ACCACGTTCTT	CCAGACGTTTGTACAG	AGCTTCAACTGAATCTGCGCAAT	CGAGGCAAT 2311
Query 241	GTGCTGTTCA	CCAGCGGATGGAGGAC	CACCTTCATCGATACGGTTAAT	GAATTCGG 300
Sbjct 2310	GTGCTGTTCA	CCAGCGGATGGAGGAC	CACCTTCATCGATACGGTTAAT	GAATTCGG 2251
Query 301	ACGGAAGTTAT	GGCTTACCACACCGAG	CACCAGCTCTTTCATGTGCGCATA	TCCAGTTC 360
Sbjct 2250	ACGGAAGTTAT	GGCTTACCACACCGAG	CACCAGCTCTTTCATGTGCGCATA	TCCAGTTC 2191
Query 361	ACCGAAGCGTT	CCTGAATCAGATCGGA	ACCGAGGTTAGAGGTCATAAT	GACGACCGTATT 420
Sbjct 2190	ACCGAAGCGTT	CCTGAATCAGATCGGA	ACCGAGGTTAGAGGTCATAAT	GACGACCGTATT 2131
Query 421	ACGGAAGTCG	ACCGTTCTCCCTTGCC	CGTCAGTCAGACGCCAT	CATCCAGTACCTGCAA 480
Sbjct 2130	ACGGAAGTCG	ACCGTTCTCCCTTGCC	CGTCAGTCAGACGCCAT	CATCCAGTACCTGCAA 2071
Query 481	CAGAATGTTG	AAGACATCCGGATGCG	TTTTTCCACTTCATCCAGCAGGAT	GACGGGAATA 540
Sbjct 2070	CAGAATGTTG	AAGACATCCGGATGCG	TTTTTCCACTTCATCCAGCAGGAT	GACGGGAATA 2011
Query 541	CGGACGACGAC	GCACCGCTTCGGTCAG	GTAGCCACCTTCTTCATAACCG	ACATATCCCGG 600
Sbjct 2010	CGGACGACGAC	GCACCGCTTCGGTCAG	GTAGCCACCTTCTTCATAACCG	ACATATCCCGG 1951
Query 601	AGGCGCACCA	CAACGAGACACCGAGT	GTTTTCTCCATAAACTCGGACAT	ATCGATACG 660
Sbjct 1950	AGGCGCACCA	CAACGAGACACCGAGT	GTTTTCTCCATAAACTCGGACAT	ATCGATACG 1891
Query 661	GACCATCGCT	CGCTATCAAACATAAAG	TTTCGCCAGCGCCTTACAAAGCT	TGTGTTTT 720
Sbjct 1890	GACCATCGCT	CGCTATCAAACATAAAG	TTTCGCCAGCGCCTTACAAAGCT	TGTGTTTT 1831
Query 721	CCCCACACCA	GTTGGGC 737		
Sbjct 1830	CCCCACACCA	GTTGGGC 1814		

Figura 7. Secuenciación del plásmido pET-15b con el inserto de ClpB de *E. coli* (Reverse). En (A) se muestra una cobertura del 93% y un porcentaje de identidad del 99.84% en la parte final del gen ClpB de la bacteria *Escherichia coli*. En (B) se muestra una comparativa entre la secuencia del plásmido pET-15b con el inserto de ClpB (Query) y el gen de ClpB de *E. coli* (Sbjct). Se observa una identidad de secuencia del 99%, y un único cambio de nucleótido de purina a purina en el alineamiento correspondiente a la parte final del gen.

A

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Secuencia gen B uniformis		1363	1363	94%	0.0	99.87%	2596	Query_423163

Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences



B

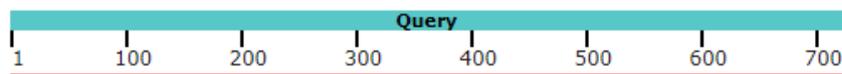
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1363 bits(738)	0.0	740/741(99%)	0/741(0%)	Plus/Plus
Query 41	ATGAACTTTAACAACCTTTACCATTAAGCGCAAGAAGCGGTGCAGGAGGCTGTGAACCTG	100		
Sbjct 1	ATGAACTTTAACAACCTTTACCATTAAGCGCAAGAAGCGGTGCAGGAGGCTGTGAACCTG	60		
Query 101	GTACAAAGCCGTGGACAGCAAGCCATCGAGCCCGTGCATGTGCTTCAAAGCGTGATGAAA	160		
Sbjct 61	GTACAAAGCCGTGGACAGCAAGCCATCGAGCCCGTGCATGTGCTTCAAAGCGTGATGAAA	120		
Query 161	GTGGGTGAAAATGTCACCAACTTCATCTTCCAGAAGCTGGGCATGAGCGGTCAGCAGATA	220		
Sbjct 121	GTGGGTGAAAATGTCACCAACTTCATCTTCCAGAAGCTGGGCATGAAACGGTCAGCAGATA	180		
Query 221	GCACTTGACTGGACAAGCAAAATGATTCTTGCCCAAGGTATCCGGCGGAGAGCCATAC	280		
Sbjct 181	GCACTTGACTGGACAAGCAAAATGATTCTTGCCCAAGGTATCCGGCGGAGAGCCATAC	240		
Query 281	CTGAGCCGTGAAACGAACGAAGTGTTCAGAAGGCCACCAATATTCCAAGGAAATGGGT	340		
Sbjct 241	CTGAGCCGTGAAACGAACGAAGTGTTCAGAAGGCCACCAATATTCCAAGGAAATGGGT	300		
Query 341	GATGAATTCGCTCCCTGGAACCGGTACTGCTGGCTTTGCTGAATGTGAAAAGCACTGCA	400		
Sbjct 301	GATGAATTCGCTCCCTGGAACCGGTACTGCTGGCTTTGCTGAATGTGAAAAGCACTGCA	360		
Query 401	TCCACCATTCTGAAAAGATGCCGGGATGACGGAACGCGAACTGCGGGAAGCCATCAACGAA	460		
Sbjct 361	TCCACCATTCTGAAAAGATGCCGGGATGACGGAACGCGAACTGCGGGAAGCCATCAACGAA	420		
Query 461	CTGCGAAAAGGAGAAAAAGTAACCTCACAAATCCAGCGAAGACACTTACCAGTCATTGGAA	520		
Sbjct 421	CTGCGAAAAGGAGAAAAAGTAACCTCACAAATCCAGCGAAGACACTTACCAGTCATTGGAA	480		
Query 521	AAGTATGCCATCAATCTGAACGAAGCAGCCCGCAGCGGCAAACTGGATCCCGTCATCGGC	580		
Sbjct 481	AAGTATGCCATCAATCTGAACGAAGCAGCCCGCAGCGGCAAACTGGATCCCGTCATCGGC	540		
Query 581	CGTGACGAAGAGATACGGCGTCTCTGCAGATTCTGAGTCGGCGTACCAAGAACAACCCG	640		
Sbjct 541	CGTGACGAAGAGATACGGCGTCTCTGCAGATTCTGAGTCGGCGTACCAAGAACAACCCG	600		
Query 641	ATTCTTATCGGTGAACCGGTACCGTAAAAACAGCTATCGTAGAGGGACTTGCCACCGT	700		
Sbjct 601	ATTCTTATCGGTGAACCGGTACCGTAAAAACAGCTATCGTAGAGGGACTTGCCACCGT	660		
Query 701	ATCTTGCGTGGAGACGTCCTCCGAGAATTGAAGAACAAACAAGTCTACTCCTGGATATG	760		
Sbjct 661	ATCTTGCGTGGAGACGTCCTCCGAGAATTGAAGAACAAACAAGTCTACTCCTGGATATG	720		
Query 761	GGTGCACCTGGTGGCTGGCGCC	781		
Sbjct 721	GGTGCACCTGGTGGCTGGCGCC	741		

Figura 8. Secuenciación del plásmido pET-15b con el inserto de ClpB de *B. uniformis* (Forward). En (A) se muestra una cobertura del 94% y un porcentaje de identidad del 99.87% en la primera parte del gen ClpB de la bacteria *Bacteroides uniformis*. En (B) se muestra una comparativa entre la secuencia del plásmido pET-15b con el inserto de ClpB (Query) y el gen de ClpB de *B. uniformis* (Sbjct). Se observa una identidad de secuencia del 99%, y un único cambio de nucleótido de purina a purina en el alineamiento correspondiente a la primera parte del gen.

A

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Secuencia gen B uniformis		1315	1315	100%	0.0	99.86%	2596	Query_11439

Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences



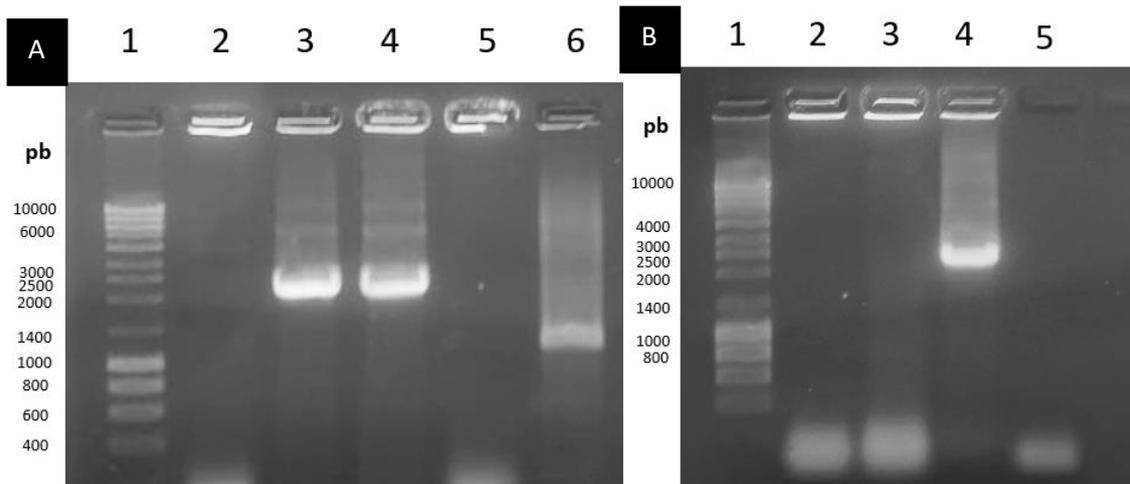


Figura 10. Comprobación de los clones positivos con el constructo pET-15b + ClpB. En el gel A, se muestra en 1 el marcador de peso molecular y de 2-6 los posibles clones positivos de *Escherichia coli*. En el gel B se muestra en 1 el marcador de peso molecular, y de 2-5 los posibles clones de ClpB de *Bacteroides uniformis*.

4.4 [Sobreexpresión y purificación de la proteína ClpB](#)

Una vez se extrajo el plásmido pET-15b con el inserto del gen ClpB, se transformaron las bacterias *E. coli* BL21-DE3 en medio LB autoinducido, con el objetivo de conseguir una sobreexpresión de la proteína ClpB derivada tanto de *B. uniformis* como de *E. coli*, además, se comparó con un control en el que se sembraron las bacterias transformadas en medio LB. Se obtuvo una concentración proteica de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en el caso de *E. coli* en medio LB, 2.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína en el medio LB autoinducido para *E. coli*, 1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína para *B. uniformis* en medio LB y 3.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en el caso de *B. uniformis* en medio LB autoinducido.

Posteriormente, se realizó un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) que se observa en la Figura 11. Se puede apreciar como a la altura de $\sim 100\text{KDa}$ se encuentra una banda con mayor grosor que el resto, que es la que corresponde a la proteína ClpB que tiene alrededor de 96 KDa. En la figura 11, se muestra el resultado correspondiente de la comparación entre las bacterias *E. coli* y *B. uniformis* en medio LB y medio LB autoinducido.

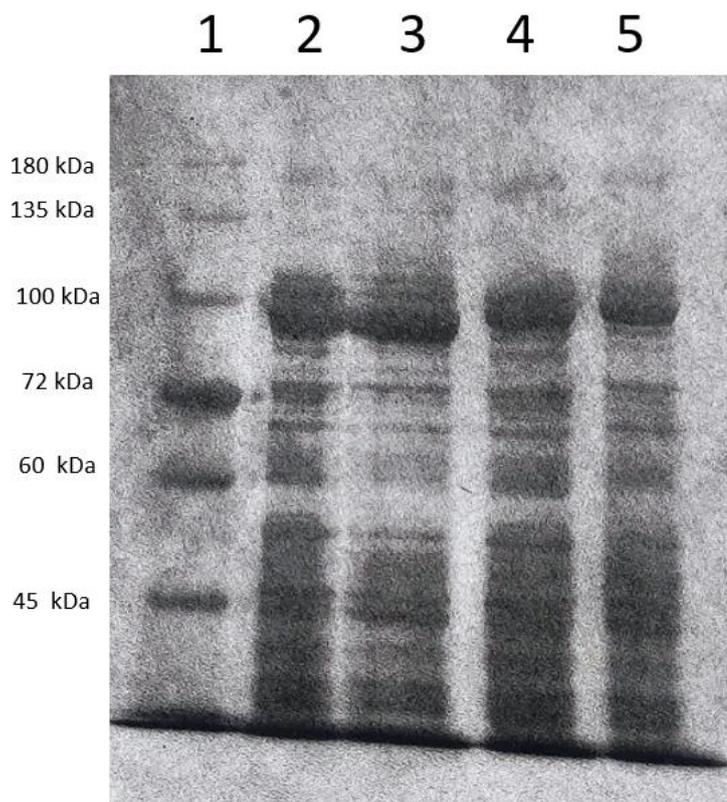


Figura 11. Sobreexpresión de la proteína ClpB de *E. coli* y *B. uniformis*. Se muestra un gel en el que se observa la sobreexpresión proteica de la proteína ClpB de *E. coli* y *B. uniformis* tanto en medio LB como en medio LB autoinducido, siendo: 1. El marcador de peso molecular, 2. *E. coli* en medio LB, 3. *E. coli* en medio LB de autoinducción, 4. *B. uniformis* en medio LB y 5. *B. uniformis* en medio LB de autoinducción. El resto de las bandas del gel, son proteínas propias de la bacteria *E. coli* BL21-DE3.

Los resultados muestran una mayor sobreexpresión proteica en los casos en los que se utilizó medio LB autoinducido tanto para la bacteria *E. coli* como para la bacteria *B. uniformis* respectivamente (carriles 2 y 4).

Finalmente, se purificaron las proteínas ClpB de *E. coli* y *B. uniformis* de bacterias BL21-DE3 que habían sido cultivadas en medio LB autoinducido, mediante el uso de columnas cromatográficas *TALON metal affinity resin* (Takara). Una vez realizado el protocolo de purificación, se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE para comprobar que la proteína ClpB había sido aislada correctamente y tenía el tamaño correspondiente (Fig. 13).

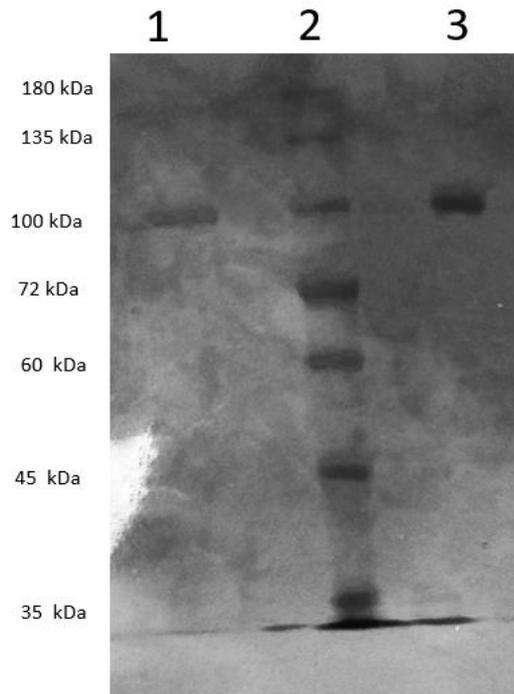


Figura 12. Purificación de la proteína ClpB de *E. coli* y *B. uniformis*. Se muestra un gel de poliacrilamida en el que se observa la purificación de las proteínas ClpB de las bacterias *Escherichia coli* y *Bacteroides uniformis*. Las muestras cargadas en los carriles son: 1, la proteína ClpB de *E. coli*, 2, el marcador de peso molecular y 3, la proteína ClpB de *Bacteroides uniformis*.

Como se aprecia en la figura 12, las bandas correspondientes a la proteína ClpB tanto de la bacteria *Escherichia coli* como la bacteria *Bacteroides uniformis*, se muestran a la altura aproximada de los 100 kDa, lo que concuerda con lo esperado, ya que el tamaño teórico es de ~ 96 kDa.

4.5 Actividad ATPasa de la enzima ClpB

Una vez se purificaron los extractos de la proteína ClpB de las bacterias *E. coli* y *B. uniformis*, se procedió a analizar si conservaban la función que realiza el péptido *in vivo*. De este modo, se realizó un ensayo colorimétrico por cuadruplicado para medir la actividad degradadora de ATP (ATPasa) de la proteína ClpB. Para ello, se midió la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) producida tras la degradación de la molécula de ATP como ilustra la figura 13. Además, se realizaron también cuadruplicados de la proteína ClpB sin adición de ATP, a modo de control negativo.

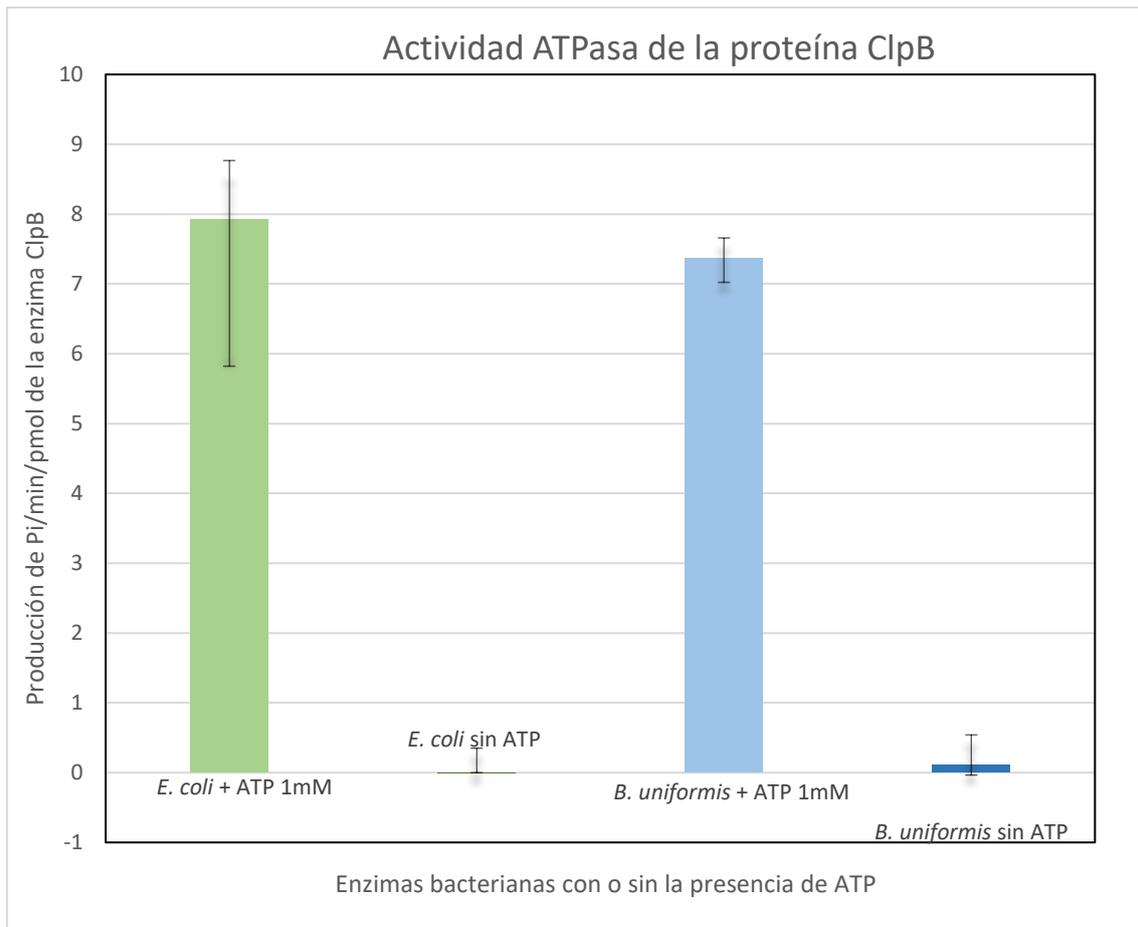


Figura 13. Actividad ATPasa de la enzima ClpB derivada de *E. coli* y *B. uniformis*. Gráfico de barras en el que se mide la actividad enzimática ATPasa como producción de Pi/min/pmol de enzima, de la proteína ClpB purificada de *E. coli* y *B. uniformis* tanto en presencia como en ausencia de ATP (1mM). Cada uno de los casos tiene un total de cuatro réplicas (n = 4).

Los resultados obtenidos en el experimento de actividad ATPasa (Fig. 13) ilustran una mayor cantidad de fosfato inorgánico producido en los casos en los que se añade ATP a la proteína ClpB, tanto de la bacteria *E. coli*, como de *B. uniformis*, en contraposición con una nula actividad ATPasa en los casos en los que no se añadió ATP, por lo que se mantiene la función proteica original.

[4.6 Alineamiento de la \$\alpha\$ -MSH con la proteína ClpB](#)

Todos los resultados anteriores surgen a partir de la gran similitud de la proteína ClpB con el péptido α -MSH, un neuropéptido anorexigénico que desempeña un papel bien conocido en la señalización de la saciedad mediante la activación de los MC4R y la liberación de la hormona saciante PYY.

Es por ello por lo que es posible la señalización intestinal local por parte de moléculas similares a la α -MSH derivadas de la microbiota hacia las células enteroendocrinas, siendo éste el caso de la proteína ClpB.

A continuación, se muestran las secuencias aminoacídicas correspondientes a la región mimética de la proteínas ClpB de *E. coli*, *H. alvei* y *B. uniformis* con el péptido α -MSH:

ECOLI_CLPB (534-550aa)	AEIAEVLARWTGIPVSR
HALVE_CLPB (534-550aa)	VEIAEVLARWTGIPVSR
BUNIF_CLPB (532-548aa)	EDIADVVSRTGIPVSK
α -MSH (Humana 1-13aa)	SYSMEHF-RW-GKPV--
	. . . ** * **

En este alineamiento se pone de manifiesto la gran similitud que existe entre ambas proteínas, aun perteneciendo a distintas especies; siendo los asteriscos (*) aminoácidos idénticos y los puntos (.) una similitud débil entre aminoácidos. Como pone de manifiesto Legrand et al. (2020), este epítipo similar a la α -MSH presenta la actividad esperada similar a la melanocortina como se confirmó mediante análisis *in silico*.

Este resultado es necesario en primer lugar, ya que, da pretexto a la realización del estudio, de este modo, se parte de la idea de que la proteína ClpB tiene propiedades saciantes por su epítipo similar al péptido α -MSH.

5. [Discusión](#)

ClpB es una proteína que se encuentra en la mayoría de las células eucariotas, y que está involucrada en un gran número de procesos biológicos, desde su actividad chaperona desplegando las proteínas que forman agregados⁶²⁻⁶⁴, hasta interviniendo en procesos de origen metabólico entre los que se incluyen el control inhibitorio de la ingesta, estimulando para ello, la liberación de PYY activando las vías anaroxigénicas^{54,58,73,74}.

La proteína ClpB, desempeña un papel esencial en la señalización de la saciedad mediante la activación de los MC4R presentes en las células enteroendocrinas del intestino, estimulando la liberación de la hormona saciante PYY^{54,58,73,74}. Estudios recientes muestran que cuando ClpB está elevada al alza a causa de la ingesta de macronutrientes en ratones obesos, aumenta tanto el PYY plasmático como el c-Fos en las neuronas POMC, lo que conlleva a la supresión de la ingesta de alimentos^{58,73}.

Por lo tanto, estos datos sugieren que las proteínas bacterianas producidas por la microbiota y tras la ingesta de alimentos, pueden señalar la terminación de la comida, pudiendo además influir en el patrón alimentario a largo plazo mediante la exposición continua a este tipo de proteínas miméticas del péptido α -MSH^{58,73,74}.

Además, recientemente se ha visto que la cepa *H. alvei* HA4597 reduce la ingesta de alimentos, el peso corporal y el aumento de masa grasa en ratones hiperfágicos y obesos. Y, aún con mayor relevancia, su presencia está asociada a la pérdida de peso corporal, una reducción significativa de la circunferencia de la cadera y una mayor sensación de saciedad en humanos con sobrepeso^{54,55,76-80}.

En el presente Trabajo de Fin de Máster, se ha estudiado la proteína ClpB producida por la bacteria comensal de la microbiota intestinal *Bacteroides uniformis* CECT 7771, por su relevante implicación en los mecanismos de la saciedad humana. Los estudios realizados en el laboratorio *Host-Interactions in Metabolic Health* muestran que esta bacteria puede reducir el aumento del peso corporal y los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos, glucosa y leptina, mejorando también la tolerancia oral a la glucosa en ratones obesos. Además, esta bacteria es capaz de modular la microbiota intestinal y las alteraciones inmunitarias asociadas a la obesidad, aumentando las células T reg y reduciendo los linfocitos B, los macrófagos totales y la relación M1/M2 tanto en el intestino como en el tejido adiposo de ratones obesos⁸¹.

Una de las principales complicaciones que se tuvieron a la hora de realizar el presente estudio, fue la elección de las enzimas de restricción. Al principio, se eligieron como posibles candidatas de enzimas de restricción con sitios de corte presentes en el plásmido pET-15b a *XbaI* y a *XhoI*. Sin embargo, tras varios meses sin obtener resultados satisfactorios y de estudiar qué factor podía estar fallando en la ecuación, se comprobó que la enzima *XhoI* no era capaz de cortar el plásmido pET-15b por una serie de razones, dentro de las cuales se detectó la pérdida del sitio de restricción por una mutación puntual en el plásmido detectada a lo largo de este estudio. Por lo que finalmente, se terminó decidiendo que se utilizaría la enzima de restricción *NdeI* para cortar en la posición *reverse* del plásmido y del gen ClpB, una proteína que se había utilizado hasta entonces en el laboratorio como control positivo de corte en el plásmido, y con la que se realizaron de nuevo todos los experimentos.

Por otro lado, en el protocolo correspondiente a la sobreexpresión y purificación de la proteína ClpB, se estudió qué condición sería la más adecuada a la hora de sembrar las

bacterias *E. coli* BL21-DE3. Tras hacer la prueba (apartado 3.11), se decidió que a la hora de realizar la purificación de la proteína ClpB a gran escala (1L) tanto la derivada de *E. coli* como la de *B. uniformis* (apartado 3.12), se utilizaría únicamente el medio LB de autoinducción, ya que había dado un rendimiento proteico significativamente mayor que el medio LB normal. Estos resultados se esperaban, ya que el medio LB de autoinducción presenta en su composición distintas fuentes de carbono que al consumirse en las distintas fases del crecimiento celular generan la inducción controlada del promotor de la RNA polimerasa que guía la expresión del gen recombinante. El modo de acción de este tipo de medio se basa en la presencia de componentes que se metabolizan de forma diferencial, para promover así el crecimiento de cultivo hasta elevadas densidades celulares, induciendo posteriormente una sobreexpresión proteica a partir de promotores basados en el operón lactosa⁸².

Por último, se realizó un análisis funcional de la proteína ClpB purificada de la bacteria *E. coli* y de la bacteria *B. uniformis*, para medir si mantenían su actividad ATPasa *in vitro*. Derivado de este estudio se comprobó que los péptidos mantenían su función de origen, por lo que, en experimentos futuros, podrían realizarse experimentos con esta proteína bacteriana purificada *in vivo*. Para ello, se suministraría este péptido con el objetivo de analizar si es capaz de disminuir la saciedad en ratones obesos, y si fuera el caso, continuar escalando el experimento hasta poder producir la bacteria *Bacteroides uniformis* como un probiótico capaz de frenar el problema mundial que supone hoy en día la obesidad.

6. Conclusiones

Las conclusiones extraídas tras haber realizado el trabajo de fin de Máster en el laboratorio *Host-Interactions in Metabolic Health* del Centro de investigación Príncipe Felipe (CIPF), son las siguientes:

- Se ha conseguido clonar en bacterias DH5- α competentes, el gen de la proteína ClpB de la bacteria *Bacteroides uniformis* CECT 7771, una cepa bacteriana que ha demostrado tener un papel importante en la regulación de la saciedad, el control del metabolismo de la glucosa, el colesterol y la leptina, así como su influencia sobre el control del peso corporal. Además, también se ha conseguido clonar el gen de la enzima ClpB de *Escherichia coli* que se ha utilizado como control en los estudios funcionales.
- Se han sobreexpresado y purificado las proteínas ClpB derivadas de organismos residentes de la microbiota (*E. coli* y *B. uniformis*) gracias a la transformación de bacterias *E. coli* BL21-DE3 competentes.

- Se ha analizado la actividad ATPasa *in vitro* de las bacterias comensales *E. coli* y *B. uniformis* midiendo la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) producido a partir de un sustrato de ATP, comprobando de este modo, que mantienen la actividad de origen.

7. Referencias bibliográficas

1. Adak, A. and Khan, M.R. (2018) 'An insight into gut microbiota and its functionalities', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(3), pp. 473–493. doi:10.1007/s00018-018-2943-4.
2. Qin, J. *et al.* (2010) 'A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing', *Nature*, 464(7285), pp. 59–65. doi:10.1038/nature08821.
3. Bäckhed, F. *et al.* (2015) 'Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life', *Cell Host & Microbe*, 17(5), pp. 690–703. doi:10.1016/j.chom.2015.04.004.
4. Zmora, N., Suez, J. and Elinav, E. (2018) 'You are what you eat: Diet, health and the gut microbiota', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(1), pp. 35–56. doi:10.1038/s41575-018-0061-2.
5. Charbonneau, M.R. *et al.* (2016) 'Sialylated milk oligosaccharides promote microbiota-dependent growth in models of infant undernutrition', *Cell*, 164(5), pp. 859–871. doi:10.1016/j.cell.2016.01.024.
6. Laursen, M.F. *et al.* (2017) 'First foods and gut microbes', *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00356.
7. Claesson, M.J. *et al.* (2012) 'Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly', *Nature*, 488(7410), pp. 178–184. doi:10.1038/nature11319.
8. Matsuki, T. and Tanaka, R. (2014) 'Function of the human gut microbiota.', *The human microbiota and microbiome*, pp. 90–106. doi:10.1079/9781780640495.0090.
9. Oren, A. and Garrity, G.M. (2021) 'Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10). doi:10.1099/ijsem.0.005056.

10. Lozupone, C.A. *et al.* (2012) 'Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota', *Nature*, 489(7415), pp. 220–230. doi:10.1038/nature11550.
11. Bäckhed, F. *et al.* (2005) 'Host-bacterial mutualism in the human intestine', *Science*, 307(5717), pp. 1915–1920. doi:10.1126/science.1104816.
12. Garrett, W.S. (2015) 'Cancer and the microbiota', *Science*, 348(6230), pp. 80–86. doi:10.1126/science.aaa4972.
13. de Martel, C. *et al.* (2012) 'Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and Synthetic Analysis', *The Lancet Oncology*, 13(6), pp. 607–615. doi:10.1016/s1470-2045(12)70137-7.
14. Sears, C.L. and Garrett, W.S. (2014) 'Microbes, Microbiota, and colon cancer', *Cell Host & Microbe*, 15(3), pp. 317–328. doi:10.1016/j.chom.2014.02.007.
15. Schwabe, R.F. and Jobin, C. (2013) 'The microbiome and cancer', *Nature Reviews Cancer*, 13(11), pp. 800–812. doi:10.1038/nrc3610.
16. Louis, P., Hold, G.L. and Flint, H.J. (2014) 'The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer', *Nature Reviews Microbiology*, 12(10), pp. 661–672. doi:10.1038/nrmicro3344.
17. Elinav, E. *et al.* (2013) 'Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms', *Nature Reviews Cancer*, 13(11), pp. 759–771. doi:10.1038/nrc3611.
18. Irrazábal, T. *et al.* (2014) 'The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer', *Molecular Cell*, 54(2), pp. 309–320. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.039.
19. Mellman, I., Coukos, G. and Dranoff, G. (2011) 'Cancer immunotherapy comes of age', *Nature*, 480(7378), pp. 480–489. doi:10.1038/nature10673.
20. Zitvogel L;Daillère R;Roberti MP;Routy B;Kroemer G; (no date) *Anticancer effects of the microbiome and its products*, *Nature reviews. Microbiology*. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28529325/> (Accessed: 12 May 2023).

21. Routy, B. *et al.* (2018) 'Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors', *Science*, 359(6371), pp. 91–97. doi:10.1126/science.aan3706.
22. Gopalakrishnan, V. *et al.* (2018) 'Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 Immunotherapy in melanoma patients', *Science*, 359(6371), pp. 97–103. doi:10.1126/science.aan4236.
23. Matson, V. *et al.* (2018) 'The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients', *Science*, 359(6371), pp. 104–108. doi:10.1126/science.aao3290.
24. Daillère, R. *et al.* (2016) 'Enterococcus hirae and Barnesiella intestinihominis facilitate cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects', *Immunity*, 45(4), pp. 931–943. doi:10.1016/j.immuni.2016.09.009.
25. Iida, N. *et al.* (2013) 'Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment', *Science*, 342(6161), pp. 967–970. doi:10.1126/science.1240527.
26. Ng, S.C. *et al.* (2017) 'Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st Century: A systematic review of population-based studies', *The Lancet*, 390(10114), pp. 2769–2778. doi:10.1016/s0140-6736(17)32448-0.
27. Xavier, R.J. and Podolsky, D.K. (2007) 'Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease', *Nature*, 448(7152), pp. 427–434. doi:10.1038/nature06005.
28. Liu, J.Z. *et al.* (2015) 'Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations', *Nature Genetics*, 47(9), pp. 979–986. doi:10.1038/ng.3359.
29. McGovern, D.P.B., Kugathasan, S. and Cho, J.H. (2015) 'Genetics of inflammatory bowel diseases', *Gastroenterology*, 149(5). doi:10.1053/j.gastro.2015.08.001.
30. Eckburg, P.B. *et al.* (2005) 'Diversity of the human intestinal microbial flora', *Science*, 308(5728), pp. 1635–1638. doi:10.1126/science.1110591.
31. 'Structure, function and diversity of the healthy human microbiome' (2012) *Nature*, 486(7402), pp. 207–214. doi:10.1038/nature11234.

32. Frank, D.N. *et al.* (2007) 'Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), pp. 13780–13785. doi:10.1073/pnas.0706625104.
33. Swidsinski, A. *et al.* (2005) 'Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease', *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), pp. 3380–3389. doi:10.1128/jcm.43.7.3380-3389.2005.
34. Barnich, N. *et al.* (2007) 'CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in crohn disease', *Journal of Clinical Investigation*, 117(6), pp. 1566–1574. doi:10.1172/jci30504.
35. Macpherson, A. *et al.* (1996) 'Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria.', *Gut*, 38(3), pp. 365–375. doi:10.1136/gut.38.3.365.
36. Ferrante, M. *et al.* (2007) 'New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour', *Gut*, 56(10), pp. 1394–1403. doi:10.1136/gut.2006.108043.
37. Benckert, J. *et al.* (2011) 'The majority of intestinal IGA+ and IGG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific', *Journal of Clinical Investigation*, 121(5), pp. 1946–1955. doi:10.1172/jci44447.
38. Gheorghe, C.E., Cryan, J.F. and Clarke, G. (2022) 'Debugging the gut-brain axis in Depression', *Cell Host & Microbe*, 30(3), pp. 281–283. doi:10.1016/j.chom.2022.02.007.
39. Clarke, G. *et al.* (2014) 'Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ', *Molecular Endocrinology*, 28(8), pp. 1221–1238. doi:10.1210/me.2014-1108.
40. Clarke, G. *et al.* (2019) 'Gut reactions: Breaking down xenobiotic–microbiome interactions', *Pharmacological Reviews*, 71(2), pp. 198–224. doi:10.1124/pr.118.015768.
41. Dwyer, J.B. *et al.* (2020) 'Hormonal treatments for major depressive disorder: State of the art', *American Journal of Psychiatry*, 177(8), pp. 686–705. doi:10.1176/appi.ajp.2020.19080848.

42. Gheorghe, C.E. *et al.* (2021) 'Investigating causality with fecal microbiota transplantation in rodents: Applications, recommendations and Pitfalls', *Gut Microbes*, 13(1). doi:10.1080/19490976.2021.1941711.
43. Li, D. *et al.* (2022) ' 3β -hydroxysteroid dehydrogenase expressed by gut microbes degrades testosterone and is linked to depression in males', *Cell Host & Microbe*, 30(3). doi:10.1016/j.chom.2022.01.001.
44. Shin, J.-H. *et al.* (2019) 'Serum level of sex steroid hormone is associated with diversity and profiles of human gut microbiome', *Research in Microbiology*, 170(4–5), pp. 192–201. doi:10.1016/j.resmic.2019.03.003.
45. Maruvada, P. *et al.* (2017) 'The human microbiome and obesity: Moving beyond associations', *Cell Host & Microbe*, 22(5), pp. 589–599. doi:10.1016/j.chom.2017.10.005.
46. Earle, K.A. *et al.* (2015) 'Quantitative imaging of gut microbiota spatial organization', *Cell Host & Microbe*, 18(4), pp. 478–488. doi:10.1016/j.chom.2015.09.002.
47. Alhassan, S. *et al.* (2008) 'Dietary adherence and weight loss success among overweight women: Results from the A to Z weight loss study', *International Journal of Obesity*, 32(6), pp. 985–991. doi:10.1038/ijo.2008.8.
48. Leone, V. *et al.* (2015) 'Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism', *Cell Host & Microbe*, 17(5), pp. 681–689. doi:10.1016/j.chom.2015.03.006.
49. Rosenbaum, M. (2005) 'Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight', *Journal of Clinical Investigation*, 115(12), pp. 3579–3586. doi:10.1172/jci25977.
50. Liou, A.P. *et al.* (2013) 'Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity', *Science Translational Medicine*, 5(178). doi:10.1126/scitranslmed.3005687.
51. Vrieze, A. *et al.* (2012) 'Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome', *Gastroenterology*, 143(4). doi:10.1053/j.gastro.2012.06.031.

52. Bauer, P.V., Hamr, S.C. and Duca, F.A. (2015) 'Regulation of energy balance by a gut–brain axis and involvement of the gut microbiota', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(4), pp. 737–755. doi:10.1007/s00018-015-2083-z.
53. Ussar, S. *et al.* (2015) 'Interactions between gut microbiota, host genetics and diet modulate the predisposition to obesity and metabolic syndrome', *Cell Metabolism*, 22(3), pp. 516–530. doi:10.1016/j.cmet.2015.07.007.
54. Breton, J. *et al.* (2016) 'Gut Commensal E. coli proteins activate host satiety pathways following nutrient-induced bacterial growth', *Cell Metabolism*, 23(2), pp. 324–334. doi:10.1016/j.cmet.2015.10.017.
55. baugh, P.J. *et al.* (2006) 'An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for Energy Harvest', *Nature*, 444(7122), pp. 1027–1031. doi:10.1038/nature05414.
56. Dinan, T.G. *et al.* (2015) 'Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior', *Journal of Psychiatric Research*, 63, pp. 1–9. doi:10.1016/j.jpsychires.2015.02.021.
57. Forsythe, P. and Kunze, W.A. (2012) 'Voices from within: Gut microbes and the CNS', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(1), pp. 55–69. doi:10.1007/s00018-012-1028-z.
58. Dominique, M. *et al.* (2019) 'Effects of macronutrients on the *in vitro* production of ClpB, a bacterial mimetic protein of α -MSH and its possible role in Satiety signaling', *Nutrients*, 11(9), p. 2115. doi:10.3390/nu11092115.
59. Million, M. *et al.* (2013) 'Correlation between body mass index and gut concentrations of lactobacillus reuteri, bifidobacterium animalis, Methanobrevibacter smithii and escherichia coli', *International Journal of Obesity*, 37(11), pp. 1460–1466. doi:10.1038/ijo.2013.20.
60. Spreckley, E. (2015) 'The L-cell in nutritional sensing and the regulation of appetite', *Frontiers in Nutrition*, 2. doi:10.3389/fnut.2015.00023.
61. Fetissov, S.O. (2016) 'Role of the gut microbiota in host appetite control: Bacterial growth to animal feeding behaviour', *Nature Reviews Endocrinology*, 13(1), pp. 11–25. doi:10.1038/nrendo.2016.150.

62. Rosenzweig, R. *et al.* (2015) 'ClpB N-terminal domain plays a regulatory role in protein disaggregation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(50). doi:10.1073/pnas.1512783112.
63. Glover, J.R. and Lindquist, S. (1998) 'Hsp104, HSP70, and HSP40', *Cell*, 94(1), pp. 73–82. doi:10.1016/s0092-8674(00)81223-4.
64. Doyle, S.M. and Wickner, S. (2009) 'Hsp104 and CLPB: Protein disaggregating machines', *Trends in Biochemical Sciences*, 34(1), pp. 40–48. doi:10.1016/j.tibs.2008.09.010.
65. Rosenzweig, R. *et al.* (2013) 'Unraveling the mechanism of protein disaggregation through a CLPB-dnak interaction', *Science*, 339(6123), pp. 1080–1083. doi:10.1126/science.1233066.
66. Seyffer, F. *et al.* (2012) 'Hsp70 proteins bind HSP100 regulatory M domains to activate AAA+ disaggregase at aggregate surfaces', *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(12), pp. 1347–1355. doi:10.1038/nsmb.2442.
67. Doyle, S.M., Hoskins, J.R. and Wickner, S. (2012) 'DnaK chaperone-dependent disaggregation by caseinolytic peptidase B (ClpB) mutants reveals functional overlap in the N-terminal domain and nucleotide-binding domain-1 pore tyrosine', *Journal of Biological Chemistry*, 287(34), pp. 28470–28479. doi:10.1074/jbc.m112.383091.
68. Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998) 'The hsp70 and HSP60 Chaperone Machines', *Cell*, 92(3), pp. 351–366. doi:10.1016/s0092-8674(00)80928-9.
69. Zolkiewski, M. (1999) 'CLPB cooperates with dnak, dnaj, and GRPE in suppressing protein aggregation', *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), pp. 28083–28086. doi:10.1074/jbc.274.40.28083.
70. Lee, S., Choi, J.-M. and Tsai, F.T.F. (2007) 'Visualizing the ATPase cycle in a protein disaggregating machine: Structural basis for substrate binding by ClpB', *Molecular Cell*, 25(2), pp. 261–271. doi:10.1016/j.molcel.2007.01.002.
71. Lee, S. *et al.* (2003) 'The structure of ClpB', *Cell*, 115(2), pp. 229–240. doi:10.1016/s0092-8674(03)00807-9.
72. Hanson, P.I. and Whiteheart, S.W. (2005) 'AAA+ proteins: Have engine, will work', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(7), pp. 519–529. doi:10.1038/nrm1684.

73. Gribble, F.M. and Reimann, F. (2019) 'Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism', *Nature Reviews Endocrinology*, 15(4), pp. 226–237. doi:10.1038/s41574-019-0168-8.
74. Cowley, M.A. *et al.* (1999) 'Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus', *Neuron*, 24(1), pp. 155–163. doi:10.1016/s0896-6273(00)80829-6.
75. Arnoriaga-Rodríguez, M. *et al.* (2020) 'Gut bacterial ClpB-like gene function is associated with decreased body weight and a characteristic microbiota profile', *Microbiome*, 8(1). doi:10.1186/s40168-020-00837-6.
76. Legrand, R. *et al.* (2020) 'Commensal *Hafnia Alvei* strain reduces food intake and fat mass in obese mice—a new potential probiotic for appetite and body weight management', *International Journal of Obesity*, 44(5), pp. 1041–1051. doi:10.1038/s41366-019-0515-9.
77. Yaswen, L. *et al.* (1999) 'Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin', *Nature Medicine*, 5(9), pp. 1066–1070. doi:10.1038/12506.
78. Krude, H. *et al.* (1998) 'Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans', *Nature Genetics*, 19(2), pp. 155–157. doi:10.1038/509.
79. Déchelotte, P. *et al.* (2021) 'The probiotic strain H. Alvei HA4597® improves weight loss in overweight subjects under moderate hypocaloric diet: A proof-of-concept, multicenter randomized, double-blind placebo-controlled study', *Nutrients*, 13(6), p. 1902. doi:10.3390/nu13061902.
80. Carbone, E.A. *et al.* (2020) 'A systematic review on the role of Microbiota in the pathogenesis and treatment of eating disorders', *European Psychiatry*, 64(1). doi:10.1192/j.eurpsy.2020.109.
81. Fabersani, E. *et al.* (2021) *Bacteroides uniformis* CECT 7771 alleviates inflammation within the gut-adipose tissue axis, involving TLR5 signaling, in diet-induced obese mice [Preprint]. doi:10.21203/rs.3.rs-134028/v1.

82. NZY Auto-induction LB Medium (powder) (no date) NZYTech. Available at:
[https://www.nzytech.com/en/mb179-nzy-auto-induction-lb-medium-powder/#:~:text=NZY%20Auto%2DInduction%20LB%20medium%20\(powder\)%20is%20an%20i nnovative,IPTG%2Dinducible%20bacterial%20expression%20systems.](https://www.nzytech.com/en/mb179-nzy-auto-induction-lb-medium-powder/#:~:text=NZY%20Auto%2DInduction%20LB%20medium%20(powder)%20is%20an%20i nnovative,IPTG%2Dinducible%20bacterial%20expression%20systems.)

ANEXOS

>ECOLI_CLPB (CP097884.1, K-12 strain) - 2574bp
ATGCGTCTGGATCGTCTTACTAATAAAATCCAGCTTGCTCTTGCCGATGCCCAATCACTT
GCACTCGGGCAGCACAACCAATTTATCGAACCACCTTCATTTAATGAGCGCCCTGCTGAAT
CAGGAAGGGGGTTCCGGTTAGTCTTTATTAACATCCGCTGGCATAAATGTGGCCAGTTG
CGCACAGATATCAATCAGGCATTAATCGTTTACCAGAGTTGAAGTACTGGTGGTGAT
GTCCAGCCATCACAGGATCTGGTGCCTTTAATCTTTGCGACAAGCTGGCGCAAAAA
CGTGGTGATAACTTTATCTCGTCAGAACTGTTCTGTTCTGGCGCACTTGAGTCTCGCGGC
ACGCTGGCCGACATCCTGAAAGCAGCAGGGGGCACCACCGCCAACATTACTCAAGCGATT
GAACAAATGCGTGGAGGTGAAAGCGTGAACGATCAAGGTGCTGAAGACCAACGTCAGGT
TTGAAAAATATACCATCGACCTTACCGAACGAGCCGAACAGGGCAAACTCGATCCGGTG
ATTGGTCTGATGAAGAAATTCGCCGTACCATTAGGTGCTGCAACGTCGTAATAAAAT
AACCCTGACTGATGGTGAACCCGGCGTCCGTAACCTGCCATCGTTGAAGGTCTGGCG
CAGCGTATTATCAACGGCGAAGTCCGGAAGGTTGAAAGCCGCGGGTACTGGCGCTG
GATATGGCCGCGCTGGTGGCTGGGGCGAAATATCGCGGTGAGTTTGAAGAAGCTTTAAAA
GGCGTCTTAACGATCTTGCCAAACAGGAAGGCAACGTCATCCTATTATCGACGAATTA
CATACCATGGTCCGGCGGGTAAAGCCGATGGCGCAATGGACGCCGGAACATGTGAAA
CCGGCGTGGCGGTGGTGAATTGCACTGCGTAGGTGCCACGACGCTTGACGAATATCGC
CAGTACATTGAAAAGATGCTGCGCTGGAACGTCGTTTCCAGAAAGTGTGTTGTCGGAG
CCTTCTGTTGAAGATACCATTGCGATTCTGCGTGGCTGAAAGAAGCTTACGAATTGCAC
CACCATGTGCAAAATTAAGTACCCGCAATTTGTTGACGCGCGACGTTGTCTCATCGCTAC
ATTGCTGACCGTCACTGCGGATAAAGCCATCGACCTGATCGATGAAGCAGCATCCAGC
ATTCGATGCGAATGACTCAAAACCAGAAGAACTCGACCGACTCGATCGTATCATC
CAGCTCAAACGGAACAACAGGCGTTAATGAAAGAGTCTGATGAAGCCAGTAAAAAACGT
CTGGATATGCTCAACGAAGAACTGAGCGACAAGAACGTCAGTACTCCGAGTTAGAGAA
GAGTGGAAAGCAGAGAAGGCATCGCTTTCTGGTACGCAGACCATTAAAGCGGAACCTGGAA
CAGCGCAAAATCGCTGTTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CTGCAATACGGCAAAATCCCGGAACCTGGAAGCAACTGGAAGCCGCAACGCAGCTCGAA
GGCAAAATATGCGTCTGTTGCGTAATAAAGTGAACCGACCGCGCAAAATGCTGAAGTGTG
CGCGTGGACGGGATCCCGTTTCTCGCATGATGGAAGCGAGCGCGAAAAACTGCTG
CGTATGGAGCAAGAACTGCACCATCGCGTAATTGGTACAGAACGAAGCGGTTGATGCGGTA
TCTAACGCTATTCTGCTAGCCGTGCGGGCTGGCGGATCCAAATCGCCGATTGGTTCA
TTCCTGTTCCCTCGGCCAACTGGTGTGGGGAAAAACAGAGCTTTGTAAGGCGCTGGCGAAC
TTTATGTTTATGATAGCGACGAGGCGATGGTCCGATCGATATGTCAGGTTTATGGAGAAA
CACTCGGTGCTCGTCTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
TACCTGACCGAAGCGGTGCGTCTGCTCCGTAATCCGTCATCCTGCTGGATGAAGTGGAA
AAAGCGCATCCGGATGCTTCAACATTTCTGTTGACAGGTAAGTATGAGCTTAACTC
GACGGGCAAGGGAGAACGGTTCGACTTCCGTAATACGGTTCGTCATTATGACCTTAACCTC
GGTCCGATCTGATTCAGGAACGCTTCGGTGAACGATGATGCGCACATGAAAGAGCTG
GTGCTCGGTGGTAAAGCCATAACTTCCGTCGGGAATTCATTAACCGTATCGATGAAGTG
GTGCTCTCCATCCGCTGGTGAACAGCACATTGCTCGATTGCGCAGATTCAGTTGAAA
CGTCTGTACAAACGCTTGGAAAGACGTTGTTATGAAATCCACATTTCTGACGAGGCGCTG
AAACTGTGACCGAAGCGTTACGATCCGCTCTATGGTGCACGTCCTCTGAAACGTGCA
ATTCAGCAGCAGATCGAAAACCCGCTGGCACAGCAAACTGCTGTTGGTGAATTGGTTCGG
GGTAAAGTATTGCGCTGGAAGTTAATGAAGACCGGATTGTCGCCCTCCAGTAA

>BUNIF_CLPB (CECT 7771 strain)- 2596 bp
ATGAACTTTAACAATTTACCATTAAAGCGCAAGAACGGTGCAGGAGGCTGTGAACCTG
GTACAAAGCCGTGGCAGCAAGCCATCGAGCCCGTGCATGTGCTTCAAAGCGTATGAAA
GTGGGTGAAAATGTCAACCAATTCATCTTCCAGAAGCTGGGCATGAACGGTCAGCGATA
GCACTTGTACTGGACAAGCAAAATGATTCTCTGCCCAAGGTATCCGGCGGAGAGCCATAC
CTGAGCCGTGAAACGAACGAAGTGTCCAGAAGGCCACCCAAATATCCAAGGAAATGGGT
GATGAATTCGCTCCCTGGAACCGGTAAGTCTGGCTTTGCTGAATGTGAAAAGCACTGCA
TCCACCATTCTGAAAGATGCGGGATGACGGAACGCGAACTGCGGGAAGCCATCAACGAA
CTGCGAAAAGGAGAAAAAGTAACTTCACAATCCAGCGAAGACACTTACCAGTCAATTGGAA
AAGTATGCCATCAATCTGAACGAAGCAGCCCGCAGCGGCAAACTGGATCCCGTCATCGGC
CGTGACGAAGAGATACGGCGTGTCTGCGAGATTCTGAGTCCGGCTACCAAGAACAACCCG
ATTTCTATCGGTGAACCGGTACCAGTAAACAGCTATCGTAGAGGGACTTGCCCACTG
ATCTTGCCTGGAGAGCTCCCGGAGAACTTGAAGAACAACAAGTCTACTCCCTGGATATG
GGTGCACCTGGTGGCTGGCGCAAGTACAAAGCGAATTTGAAGAAGCTCTGAAGGCGGTT
ATCAACGAAGTGAAGAAGTCCGAAGGAGACATTATCCTCTTCAATGATGAAATCCATACC
TTGGTGGGTGCGGCAAGGGCAAGGTGCCATGGATGCGCGCAACATCTTGAACCCGCGC
TTGGCACGCGGTGAACAGGAGCATCGGGCCACTACCTCGATGAATATCAGAAGTAT
TTCGAAAAGGACAAAGCGTTGGAGCGCCGCTTCCAGATTGTCATGGTGAACGAACCGGAC
ACGCTGAGACCAATCTCATTCTGCGTGGTCTGAAGGAACGTTATGAGAACCATCACCAC
GTACGGATTAAGGAGCATGCCATCATCGCGCCGTAGAGTTGAGCAACCGTTACATCACC
GACCGTTTCTGCGGACAAGGCTATCGACCTGATGGACGAAGCCCGCCAAAGCTGCGT
ATGGAGGTCGATTCCGTACCAGGAGCTGGACGAGATTTCCGTAAGATAAAGCAGCTG
GAGATTGAACGTGAAGCCATCAAGCGCGAAAACGCAAGCCCAAACTGGAACAAATCGGC
AAAGAACTTGCCAGCTGAAAGAGCAGGAAAACCTGTAACAAGCGAAATGGCAAGTGA
AAGACCTTGTGCAAAATCCAGCAGAAATAAGGTTGAAAATAGAGAACCTGAAGTTGAG
GCCGACAAGGCTGAACGGGAAGGCGACTATGGCCGGTGGCCGAAATACGCTACGGCAAA
CTGCAAGCGCTGAACAGGAGATTGAAGAAACGCAGCAAAAACCTGCACGAAATGCAGGGT

GACAAGGCCATGAATTAAGAGGAAGTGGACGCTGAAGACATCGCCGACGTAGTATCCCG
CTGGACCGGCATACCGGTAAGCAAGATGCTGCAAAGCGAAAAGGACAAACTGTTGCATCT
GGAGCGGAACTGCACCAGCGGGTTATCGGGCAGGACGAAGCCATCGAGGCCGTATCCGA
TGCCGTACGCCGAGTTCGTGCCGGACTGCAAGACCCGAAACGTCCATCGGGTCATTCT
TTTCTGGGAACCACCGGTAGGTAAGACGGAATTGGCAAAGGCCGTGGCGGAGTTCCT
CTTTGACGACGAGACGATGATGACCCGTATCGACATGAGCGAGTATCAGGAGAAACACAG
TGTTTCCCGTCTGGTAGGAGCGCCTCCGGGATATGTGGGCTACGATGAAGGTGGACAAC
GACAGAAGCCGTAAGGGGAAACCGTATTCTGTGTCCTATTTCGACGAAATCGAGAAAGC
GCATCCGGACGTATCAACATCTTGCTGCAAGTGCTGGATGACGGACGTCTGACGGACAA
CAAAGGGCGTACGGTCAACTTCAAGAATACGATTATCATCATGACCTCCAACATGGGCAG
CGGCTATATCCAAAGCCAGATGGAGAAGCTCAACAGTAGCAATAAGGAGCAAATCGTAGA
GGAAACCAAAAAGGAAGTGAATATGCTGAAAAAGACCATCCGCCCGGAATTCCTGAA
CCGTATCGACGAGACCATCATGTTCTGCCACTGACAGAGCCGAAATCAAGCAAATGT
GGTGCTCCAAATCAAGAGTGTGCAGAAGATGCTTCCGGTAACGGTGTGGAACCTGTTCT
GACAAATGCTGCCATAGACTTCCTTGCCAATGCAGGGTATGACCCGAAATTCGGCGCCG
TCCGGTGAACGTGCCATCCAGCACTATTTGCTGAACGACTTGTGGAAGAAGCTGCTGGC
TCAGGAAGTAGACCCGAGCAAGCCTATTACAGTGGATGCCAATACCACTGACGACGGACT
GGTTTCAGAAATTA