

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“Identificación de proteínas de membrana de
Helicobacter pylori que unen hemoglobina humana”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

M en C. MARCO ANTONIO GONZÁLEZ LÓPEZ

Director de tesis

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

México, D.F. Octubre 2013.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. José de Jesús Olivares Trejo
Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Norma Velázquez Guadarrama
Laboratorio de Bacteriología Intestinal. Departamento de Infectología.
Hospital Infantil de México. Federico Gómez

Dr. Javier Hernández Sánchez
Departamento de Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de IPN

Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez
Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga.
Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio 4 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

La realización del presente trabajo contó con el apoyo financiero del CONACyT. Acuerdo CONACyT-Salud 2010-01-139945. También se contó con el apoyo del convenio ICyTDF/ 328/ 2011.

Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT DF). Beca de Doctorado BI-080530175442 y por la extensión de beca convenio ICyT/ 179/ 2011.

La impresión y empastado de esta tesis se logró gracias al apoyo otorgado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y la Coordinación de Servicios Estudiantiles.

DEDICATORIA.

A mí querida esposa **Altagracia** porque siempre ha estado a mi lado, apoyándome y sobre todo porque entiende lo importante que es para mí la Ciencia.

A mí querida hija **Alitzel Naollin** porque aunque no lo sabe es mi principal motivación y espero el día en que pueda leer y entender esto que escribo.

A mi (enorme) familia porque ahí es donde recibí mi primer formación, me educaron y aguantaron por ello Gracias a mi papá **Max**, mamá **Gaby**, mis hermanos **Bety**, **Laura**, **Francisco** y **Jesús**.

A mi otra familia (de Altagracia) porque con ellos aprendía a ver la otra cara de este mundo.

A mis compañeros de Ciencias Genómicas porque simplemente este posgrado es único gracias a quienes formamos parte de él. Sobre todo a mis compañeros de generación.

Y no podía faltar mi mejor amigo **José Luis Velázquez Ramírez**, porque es un ejemplo tanto en lo académico como en la vida social.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por darme un espacio y otorgarme el apoyo académico necesario para realizar el Doctorado en Ciencias Genómicas, por lo cual le agradezco profundamente.

A la planta académica del Posgrado en Ciencias Genómicas por ayudarme con sus recomendaciones y orientarme para que mi proyecto llegara a término.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES GENERALES.....	1
1.1 El descubrimiento de la bacteria.....	1
1.2 Microbiología de <i>Helicobacter pylori</i>	4
1.2.1 Epidemiología.....	5
1.2.2 Transmisión.....	5
1.2.3 Enfermedades asociadas.....	6
1.2.3.1 Gastritis.....	6
1.2.3.2 Gastritis aguda.....	6
1.2.3.3 Gastritis crónica.....	7
1.2.3.4 Úlcera péptica.....	7
1.2.3.5 Dispepsia no ulcerosa.....	7
1.2.3.6 Cáncer gástrico.....	8
1.2.3.7 Linfoma MALT.....	8
1.2.4 Factores de virulencia.....	8
1.2.4.1 Adhesinas.....	8
1.2.4.2 Citotoxina vacuolisante (VacA).....	9
1.2.4.2 Proteína CagA.....	9
1.2.4.3 LPS (Lipopolisacaridos).....	9
1.2.4.4 Ureasa.....	10
1.2.4.5 Flagelos.....	10
1.2.4.6 Hemaglutininas.....	10
1.3 El hierro.....	11
1.3.1 Importancia del hierro y su almacenamiento.....	12

1.3.2 Proteínas que unen hierro libre.....	13
1.3.3 Proteínas que unen hierro a través del grupo hemo (hemoproteínas)	14
1.3.4 La adquisición de hierro por las bacterias.....	15
1.3.4.1 Sideróforos.....	16
1.3.4.2 Hemóforos.....	17
1.3.4.3 Receptores.....	18
1.3.4.3.1 Receptores para sideróforos.....	18
1.3.4.3.2 Receptores para hemóforos.....	19
1.3.4.3.3 Receptores para transferrina y lactoferrina.....	19
1.3.4.3.4 Receptores para el grupo hemo y hemoproteínas.....	19
1.3.4.3.4.1 Mecanismo de acción de los receptores para el grupo hemo y hemoproteínas.....	22
1.3.4.3.4.2 Sistema TonB.....	22
1.3.4.3.4.3 Transportador tipo ABC.....	23
1.3.5 Método de estudio de los mecanismos de adquisición de hierro a partir de Hb.....	25
2. ESTADO DEL ARTE.....	28
2.1 Antecedentes particulares.....	28
2.1.1 Deficiencia de hierro en el hombre.....	28
2.1.2 <i>Helicobacter pylori</i> y la mal absorción de hierro en el hombre.....	28
2.1.3 <i>H. pylori</i> adquiere hierro a partir de su hospedero.....	29
3. IMPORTANCIA DE CONTINUAR CON EL TEMA.....	31
II. OBJETIVOS.....	32
1. Objetivo general.....	32
2. Objetivos particulares.....	32
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
1. Cepas bacterianas.....	34
2. Condiciones de crecimiento bacteriano.....	34
2.1 <i>H. pylori</i>	34
2.2 <i>E. coli</i>	34

3. Identificación microscópica de <i>H. pylori</i> y <i>E. coli</i> mediante tinción de Gram.....	34
4. Pruebas bioquímicas.....	35
4.1 Catalasa.....	35
4.2 Ureasa.....	35
5. Obtención de DNA genómico de <i>H. pylori</i>	36
6. Amplificación de los genes <i>glmM</i> , <i>cagA</i> , <i>cagE</i> y <i>vacA</i> por PCR.....	37
7. Geles de agarosa.....	38
8. Obtención de proteínas.....	38
8.1 Proteínas secretadas.....	38
8.1.1 <i>H. pylori</i>	38
8.1.2 <i>E. coli</i>	38
8.2 Proteínas totales.....	39
8.2.1 <i>H. pylori</i>	39
8.2.2 <i>E. coli</i>	39
8.3 Proteínas citoplásmicas.....	40
8.3.1 <i>H. pylori</i>	40
8.3.2 <i>E. coli</i>	40
8.4 Proteínas de membrana.....	41
8.4.1 <i>H. pylori</i>	41
9. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad (resina).....	41
10. Elución de proteínas con diferentes ligandos.....	42
11. Eliminación de contaminantes de las proteínas.....	42
12. Determinación de la concentración de proteínas.....	43
13. Preparación de muestras para electroforesis ene SDS-PAGE.....	43
14. Resolución de proteínas en geles SDS-PAGE.....	43
15. Tinción de proteínas con azul de Coomassie.....	44
16. Tinción de proteínas con nitrato de plata.....	44
17. Espectrometría de masas LC-MS/MS.....	44
18. Inmunodetección.....	45
19. Ensayo de Overlay.....	45

20. Alineamiento de secuencias tipo GroEL.....	46
21. Modelaje en el espacio de proteínas.....	46
V. RESULTADOS.....	47
1. Crecimiento bacteriano.....	47
1.1 <i>E. coli</i>	47
1.1.1 Identificación microscópica de <i>E. coli</i> mediante tinción de Gram.....	47
1.2 <i>H. pylori</i>	47
1.2.1 Identificación microscópica de <i>H. pylori</i> mediante tinción de Gram.....	50
2. Pruebas bioquímicas.....	50
2.1 Catalasa y ureasa.....	50
3. Amplificación de los genes <i>glmM</i> , <i>cagA</i> , <i>cagE</i> y <i>vacA</i> por PCR.....	50
4. Proteínas de los agares de cultivo purificadas por cromatografía de afinidad.....	52
5. Proteínas de membrana de <i>H. pylori</i> purificadas por cromatografía de afinidad.....	56
6. Identificación por espectrometría de masas de proteínas de membrana purificadas por cromatografía de afinidad de <i>H. pylori</i>	59
7. Proteínas de membrana de <i>H. pylori</i> purificadas por cromatografía de afinidad que además de unirse al grupo hemo unen Hb.....	61
8. La vitamina B ₁₂ compete con la Hb por la unión a las proteínas de membrana de <i>H. pylori</i> purificadas por cromatografía de afinidad.....	63
9. Purificación de proteínas secretadas por <i>H. pylori</i> por cromatografía de afinidad.....	65
10. Las proteínas secretadas y las proteínas celulares (totales) de <i>H. pylori</i> no se mezclan.....	65
11. Purificación de proteínas secretadas por <i>H. pylori</i> por cromatografía de afinidad.....	67
12. La proteína secretada de 58 kDa es eluida de la cromatografía de afinidad por compuestos que contienen hierro.....	69
13. La proteína de 58 kDa es eluida específicamente por hierro y no por otros cationes.....	72

14. La proteína de 58 kDa secretada por <i>H. pylori</i> fue identificada como Chaperona GroEL.....	74
15. HpGroEL tiene una mayor cantidad de Histidinas y Tirosinas que otras proteínas GroEL.....	77
16. La proteína GroEL de <i>E. coli</i> no une al grupo hemo.....	80
VI. DISCUSIÓN.....	84
VII. CONCLUSIONES.....	87
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
VIII. APÉNDICE.....	99
1. Soluciones.....	99
2. Publicaciones.....	101

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ABC	Cassete de Unión a ATP
ATCC	Colección de Cultivo Tipo de America
ATP	Adenosina Tri Fosfato
ATPasa	Enzima que hidrolisa el ATP
BLAST	Alineamiento de secuencia tipo local
C	Citosina
cols,	Colaboradores
cm	Centímetro
Da	Dalton
D. O.	Densidad Óptica
DNA	Acido dexosirribonucleico
DTT	Dietiotreitol
EDTA	Acido Etilen Diamino Tetraacético
EV	Electrovoltio
G	Guanina
g	Gravedades
h	Hora
Hb	Hemoglobina
Hm, hm	Grupo hemo
HRP	Peroxidasa de Rabano Picante
K_d	Constante de disociación
kDa	Kilodaltones
kV	Kilovoltio
l	Litro
LB	Medio de cultivo Luria-Broth
LC-MS/MS	Cromatografia Liquida-Espectrometria de Masas en tándem
M	Molar

mA	miliampers
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nm	nanometro
nl	Nanolitro
nM	Nanomolar
O. N	Durante toda la noche
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PBST	Amortiguador de fosfatos salino y Tween
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial de hidrogeno
pI	Punto Isoeléctrico
PM	Peso Molecular
PMSF	Fluoruro de Fenil Metil Sulfonilo
PSA	Persulfato de Amonio
RNA	Acido Ribonucleico
RNAsa	Enzima que degrada el RNA
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
T. A	Temperatura Ambiente
TEMED	N,N,N',N', tetrametilen-diamina
TAE	Tris Acetato EDTA
Tm	Temperatura de alineamiento
Tris	Tris (Hidroxximetil)-amino-metano
Tris HCl	Tris (Hidroxximetil)-amino-metano Acido
V	Voltaje
μ	Micras
μg	Microgramo

μl	Microlitro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. *H. pylori* sobre la mucosa gástrica.
- Figura 2. Factores de virulencia de *H. pylori*.
- Figura 3. Estructura de la enterobactina y ferricromo.
- Figura 4. Estructura tridimensional resuelta por cristalografía del hemóforo HasA de *S. marcescens* unido a un grupo hemo,
- Figura 5. Alineamiento de proteínas que unen Hb, grupo hemo y hemoproteínas.
- Figura 6. Modelo hipotético de un receptor de Hb HmbR de *N. meningitidis*,
- Figura 7. Esquema que representa el mecanismo de acción de receptores para hemóforos y hemoproteínas
- Figura 8. Representación de una bacteria Gram negativa y la obtención de hierro por diferentes vías.
- Figura 9. Proteínas de la fracción soluble y membranal de células *E. coli* transformadas y que sobreexpresan la proteína HmuR.
- Figura 10. Curva de crecimiento.
- Figura 11. Alineamiento la secuencia que une HB de *H. pylori* y secuencias relacionadas de otras bacterias.
- Figura 12. Modelo de obtención de hierro a partir de hierro-dicitrato.
- Figura 13. Estrategia experimental.
- Figura 14. Monitoreo del crecimiento de *E. coli*.
- Figura 15. Monitoreo del crecimiento de *H. pylori*.
- Figura 16. Amplificación por PCR de genes los *glmM*, *cagA*, *cagE* y *vacA* de *H. pylori*.
- Figura 17. Proteínas del agar Casman (suplementado con sangre de carnero) que se unen a la cromatografía de afinidad.
- Figura 18. El agar Casman suplementado con FeCl_3 5mM no contiene proteínas afines al grupo hemo.

Figura 19. Proteínas de membrana de *H. pylori* afines al grupo hemo.

Figura 20. 8 proteínas de membrana de *H. pylori* son afines al grupo hemo.

Figura 21. Overlay, algunas proteínas de membrana de *H. pylori* tienen la capacidad de unirse al grupo hemo, Hb o Vitamina B₁₂.

Figura 22. Esquemas de las estructuras de la Hb, grupo hemo y la Vitamina B₁₂.

Figura 23. Las proteínas secretadas tanto por *H. pylori* como por *E. coli* no se contaminan con sus proteínas totales.

Figura 24. *H. pylori* posee una proteína de 58 kDa afín al grupo hemo.

Figura 25. Estructura del grupo hemo.

Figura 26. La proteína de 58 kDa es eluida por compuestos que contienen hierro.

Figura 27. La proteína de 58 kDa es eluida solamente por el hierro.

Figura 28. La proteína de 58 kDa fue identificada como GroEL (HpGroEL).

Figura 29. Hemóforo HasA de *S. marcescens*.

Figura 30. Alineamiento de aminoácidos de diferentes proteínas GroEL.

Figura 31. La proteína chaperona GroEL de *E. coli* (EcGroEL) no une el grupo hemo.

Figura 32. Modelaje en el espacio de las proteínas HpGroEL y EcGroEL

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las metaloproteínas que unen hierro.

Tabla 2. Proteínas que unen hierro libre.

Tabla 3. Proteínas que unen el grupo hemo.

Tabla 4. Contenido de hierro en las hemoproteínas.

Tabla 5. Proteínas y moléculas que unen hierro.

Tabla 6. Proteínas de *H. pylori* identificadas por espectrometría de masas.

Tabla 7. Características de la proteína GroEL de *H. pylori* identificada por espectrometría de masas.

RESUMEN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa que infecta varias zonas del estómago y el duodeno. Está presente en padecimientos como las úlceras pépticas, gastritis, duodenitis y algunos casos de cáncer son causados por la infección de *H. pylori*. Esta bacteria tiene la capacidad de sobrevivir en varios entornos en el ser humano. Como cualquier patógeno requiere de altas concentraciones de hierro para crecer en el huésped. Esta bacteria tiene un comportamiento especial, ya que está adaptada para utilizar Lf, Tf, hemo y Hb como fuentes de hierro. Se sabe que expresa una proteína de membrana que une Lf, esta proteína proporciona a *H. pylori* la capacidad de utilizar Lf como fuente de hierro. Por otro lado, se han encontrado tres proteínas de membrana con la capacidad de unir hemo cuyos pesos son de 48, 50 y 77 kDa pero aún no han sido identificadas. Además, dos proteínas de membrana denominadas FrpB1 (88,5 kDa) y FrpB2 (90,8 kDa) se han identificado . Estas proteínas pueden unirse Hb y FrpB1 también pueden unir hemo. Existe evidencia para pensar que *H. pylori* puede utilizar casi cualquier fuente de hierro disponible en el ser humano a través de un mecanismo directo, porque expresa al menos ocho proteínas de membrana. Sin embargo, los estudios de laboratorio han mostrado que *H. pylori* expresa otras proteínas que podrían estar involucradas en la adquisición de hierro. En este trabajo se identificó la proteína FrpB3 que es parte de la familia de proteínas de membrana reguladas por hierro, de los cuales se han caracterizado FrpB1 and FrpB2, el siguiente paso es caracterizar FrpB3 y determinar su papel en la absorción de hierro. Por otra parte estamos presentando nuevos hallazgos que revelan la existencia de una nueva proteína que une hierro. Esta proteína se purificó por cromatografía de afinidad acoplada a hemo. El análisis por espectrometría de masas reveló su identidad como la chaperonina (HpGroEL). Proponemos que HpGroEL es secretada junto a la ureasa y otras proteínas y que necesita de hierro para mantener su correcto plegamiento para soportar el medio ambiente hostil presente en el estómago.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is an helical shaped Gram-negative bacterium that infects various areas of the stomach and duodenum. Many cases of peptic ulcers, gastritis, duodenitis and perhaps some cancer are caused by *H. pylori* infection. This bacterium has the capacity to survive in several environments in the human. As any pathogen require high concentrations of iron to grow in the host. This bacterium has an special behaviour because it is adapted to use Lf, Tf, haem and Hb as iron source. It is known that expresses a Lf-binding membrane protein, this protein gives to *H. pylori* the ability to use Lf as iron source. On the other hand three haem-binding membrane proteins with sizes around 48, 50 and 77 kDa have been related to iron acquisition, however, their respective identities remain unknown. In addition, two membrane proteins termed FrpB1 (88.5 kDa) and FrpB2 (90.8 kDa) have been identified. These proteins can bind Hb and FrpB1 can also bind haem. Although there is enough evidence to think that *H. pylori* can utilize almost any iron supply available into the human through a direct mechanism because expresses at least eight membrane proteins to bind them. However these findings, laboratory studies have shown that *H. pylori* express other proteins that could be involved in iron acquisition from Hb. We identified the protein FrpB3 which is part of the family of membrane proteins regulated by iron, of which we have characterized FrpB1 and FrpB, the next step is to characterize FrpB3 and determine their role in the iron uptake. By other hand we are presenting new findings that reveal the existence of a new iron-binding protein. This protein was purified by affinity chromatography coupled to haem. The analysis by mass spectrometry revealed its identity as a chaperonine (HpGroEL). We propose that HpGroEL is secreted together Urease and other proteins in order to maintain their appropriate folding, but maybe this chaperonine needs have particular characteristics like binds iron, to support the hostile environment presented in the stomach.

I. INTRODUCCIÓN.

1. ANTECEDENTES GENERALES.

En 1982 Barry Marshall y Robin Warren identificaron una bacteria en una biopsia gástrica que en aquel entonces llamaron *Campylobacter pyloridis*. No sospecharon, en aquel momento, que se trataba de la bacteria que infecta a más de la mitad de la población mundial. De hecho, es el principal agente etiológico de la gastritis aguda, gastritis crónica, úlcera peptídica, carcinoma gástrico y cáncer de células B, asociado a tejido linfoide (MALT) (Marshall y Warren; 1985).

1.1 El descubrimiento de la bacteria.

El primer reporte relacionado con la bacteria que hoy llamamos (*Helicobacter pylori*) *H. pylori* se realizó aproximadamente 90 años antes de los hallazgos de Marshall, fue elaborado por el anatomista Giulio Bizzozero quien observó una serie de espiroquetas en glándulas gástricas de perro (*Helicobacter canis*) (Figura y Orderda; 1996). Posteriormente, se logró infectar el estómago de gatos con esta bacteria, lo que representó un gran avance por representar el primer modelo animal para probar terapias y vacunas que ayudarían a erradicar esta bacteria (Chen y cols, 1995). En 1940 Doenges, Freedberg y Baron localizaron organismos espirales en la mucosa gástrica adyacentes a células cancerosas (Doenges; 1939) (Freedberg y Baron; 1940). En la década de los 60s Susumu Ito realizó microscopía electrónica de la mucosa gástrica, obteniendo una excelente imagen de la bacteria (Figura 1). Posteriormente, en 1970 Sterr y Colin-Jones probaron diferentes terapias para el tratamiento de la inflamación causada por úlcera gástrica (Steer y cols, 1975). Así mismo, Warren en 1979 observó que algunas preparaciones de mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica activa presentaban unas líneas azules (bacilos) que se encontraban adheridos a la superficie del epitelio, en 1981 Marshall, tomo muestras de mucosa gástrica sana

y no identificó al bacilo. Diseñó el medio de cultivo ideal para el crecimiento de esta bacteria. En 1982 Warren decide dar a conocer los resultados de su investigación, dicha información no fue bien recibida, porque no se concebía la idea de que una bacteria viviera en un medio ácido como el estómago, además, se tenía el concepto de que la gastritis era un padecimiento debido a úlcera gástrica y no a una úlcera duodenal como lo postulaba.

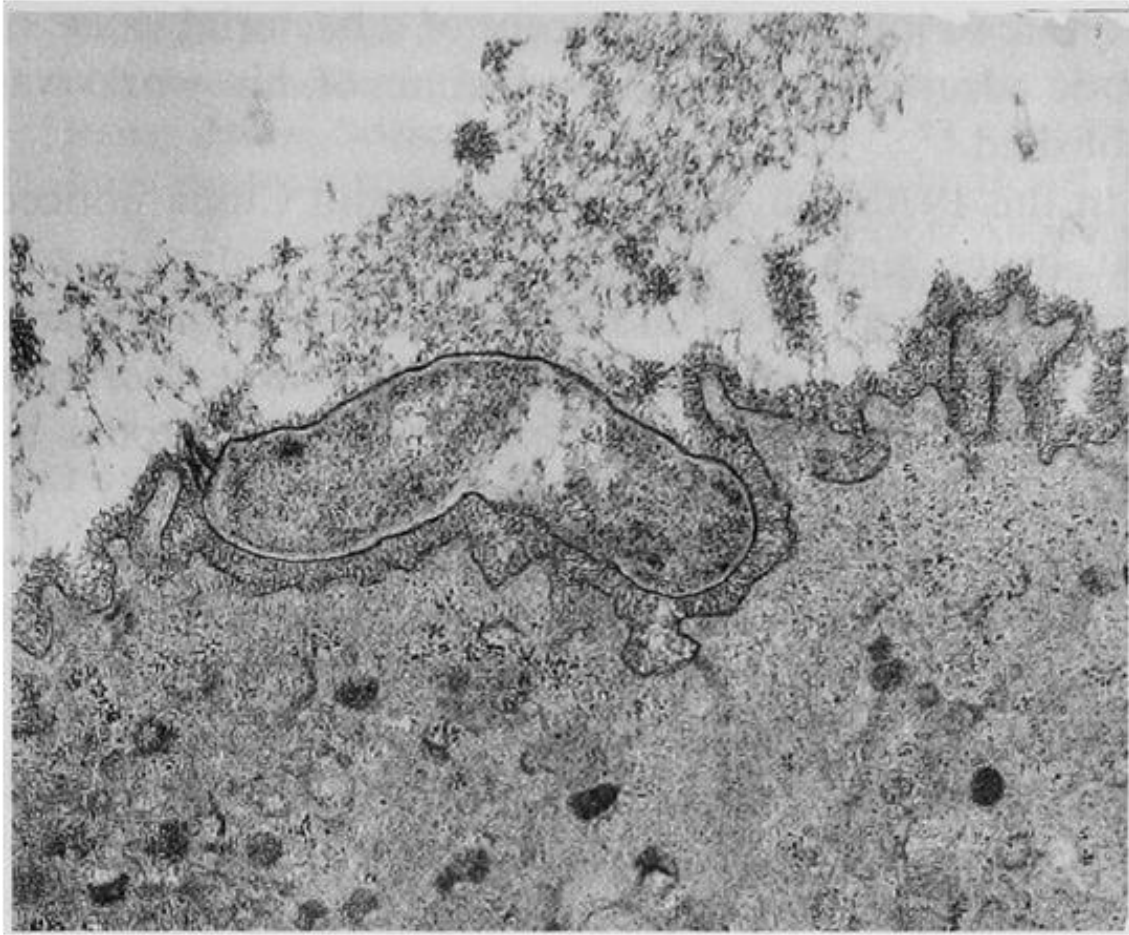


Figura 1. *H. pylori* sobre la mucosa gástrica. Microscopia electrónica tomada por Ito Susumu en 1967 (Tomado de Marshall, 2002).

Finalmente, Warren y Marshall publicaron sus resultados el 4 de junio de 1983 en la revista Lancet, bajo el título: *Unidentified curved bacilli on the gastric epithelium in active chronic gastritis*, (Marshall y Warren; 1984). Estos investigadores observaron que esta bacteria era muy parecida a *Campylobacter*, por su morfología curva, crece en medios enriquecidos, en condiciones microaerófilas, no fermenta la glucosa, es sensible al metronidazol y tiene un contenido de G + C del 34%, por lo que la llamaron *Campylobacter pyloridis* (Anonymous; 1985). En 1987 se renombró como *Campylobacter pylori* (Marshall y Goodwin, 1987). No obstante, se tenían dudas si realmente era un *Campylobacter* porque al realizar microscopía electrónica, se observó que este nuevo *Campylobacter* poseía varios flagelos en un polo y la especie *Campylobacter spp* solo presenta hasta dos flagelos (Goodwin y cols, 1985). Además, los perfiles de proteínas y ácidos grasos también eran diferentes entre estas bacterias (Goodwin y cols, 1985, Pearson y cols, 1984). Finalmente al hacerse el análisis de la secuencia del ARNr 16S se observó que estas bacterias están genéticamente distanciadas por lo que se excluyó del género *Campylobacter*, así dio origen al nuevo género *Helicobacter*, nombrando a esta bacteria como *H. pylori* (Goodwin y cols, 1989).

1.2 Microbiología de *H. pylori*.

Es una bacteria perteneciente al género ϵ (Épsilon bacteria) subdivisión *Proteobacteria*, orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteraceae*. Actualmente, *Helicobacter* alberga aproximadamente 20 especies. Además, se clasifica como bacteria Gram negativa. Mide de 2 a 4 μ de largo por 0.5 a 1 μ de ancho y puede estar en forma de bacilo o coco. La forma cocoide es característica cuando la bacteria está en un ambiente desfavorable. El bacilo posee de 2 a 6 flagelos cuya longitud es de aproximadamente 3 μ . Los flagelos le proporcionan movilidad a través de la mucosa gástrica (O'Toole y cols, 2000). Para su crecimiento *in vitro* *H. pylori*, requiere de suplementos y condiciones especiales que favorecen su desarrollo. La bacteria es microaerófila por lo que requiere de un medio con 10% de CO₂ y humedad. Su temperatura ideal de crecimiento es

37°C, tiene la capacidad de sobrevivir a pH ácido, sin embargo, se desarrolla mejor en un medio alcalino (su intervalo de pH es de 5.5 a 8.0) (Stingl y cols, 2002). Además, para optimizar el crecimiento de la bacteria los medios de crecimiento se suplementan con sangre o suero de caballo o carnero, los cuales proporcionan fuentes adicionales de nutrientes. En cultivos líquidos el suplemento con β ciclodextrinas favorece el desarrollo de *H. pylori* (Taneera y cols, 2002).

1.2.1 Epidemiología.

H. pylori infecta aproximadamente 50% de la población mundial; aunque, existe una amplia variación en su porcentaje de prevalencia: Ejemplos, Francia 25% (Megraud y cols, 1989); Nigeria 80% (Holcombe y cols, 1992), India 60% (Graham y cols, 1991), México 70% (Torres y cols, 1998) y Perú 71.4% (Klein y cols, 1994). En México, la infección afecta a niños entre los 6 y 10 años, en personas mayores a 23 años los porcentajes de seropositividad son superiores al 80% (Torres y cols, 1998). Existe una menor incidencia en países desarrollados principalmente por las condiciones de higiene (Pérez-Pérez y cols, 2002). Otros factores, tales como: nivel socioeconómico (Haeckel; 1996), carga genética, pertenecer al grupo sanguíneo O (Azuma y cols, 1994), y el género parecen tener relación con la prevalencia (Murray y cols, 1997).

1.2.2 Transmisión.

La bacteria *H. pylori* está mayormente distribuida en poblaciones de bajos recursos. Existe una relación entre la infección y la higiene. Entre las posibles vías de infección se encuentran: oral-oral, gastro-oral y fecal-oral. La transmisión oral-oral se sustenta por haber localizado esta bacteria en placa dental y saliva; además, en muestras de saliva la prueba de la ureasa ha sido positiva (Majmudar y cols, 1990). Por otra parte la transmisión gastro-oral se relaciona con el uso de gastroscopios y el vómito. La transmisión fecal-oral viene de la presencia de esta bacteria en las heces y en el agua contaminada con las mismas (Osato y cols,

1998). Actualmente se acepta, aún sin poder descartar otras rutas, que el contagio se realiza mediante un mecanismo de persona a persona, bien a través de la vía fecal-oral, oral-oral y ambas posiblemente mediadas por diversos vectores como fómites, saliva, alimentos o aguas contaminadas. En la infancia, la vía de transmisión es la oral-oral y fecal-oral, a través de la vía respiratoria (Taylor y Blazer; 1991). El consumo de mariscos, vegetales crudos y agua contaminados son posibles fuentes de infección (Taylor y Blazer; 1991).

1.2.3 Enfermedades asociadas.

H. pylori coloniza el estómago sin causar enfermedad. Sin embargo, debe considerarse como un factor de riesgo para el desarrollo de varios desordenes clínicos en el tracto gastrointestinal. Todas las personas que hayan sido colonizadas por *H. pylori* presentan gastritis sintomática o asintomática. Entre el 10 y 20% presentaran ulceraciones y 1 a 2% tendrá el riesgo de padecer cáncer gástrico. No obstante, el desarrollo de la enfermedad dependerá del estado de salud del hospedero y de factores ambientales (Kusters y cols, 2006).

1.2.3.1 Gastritis.

H. pylori puede infiltrarse a la mucosa gástrica en el antro o en el cuerpo del estómago. Esto provoca que células mononucleares y neutrófilos también se infiltren, ocasionando inflamación. La gastritis crónica es la primera condición que señala la presencia de *H. pylori* (Kusters y cols, 2006).

1.2.3.2 Gastritis aguda.

La información de la gastritis aguda por *H. pylori* viene de casos de ingestión involuntaria o voluntaria de la bacteria. Los pacientes presentan síntomas como náuseas, vómito e inflamación de la parte proximal y distal de la mucosa gástrica.

Durante este período el paciente padece hipoclorhidria. Este tipo de padecimiento puede revertirse espontáneamente, sobre todo en niños pero se ignora como sucede (Granstrom y cols, 1997).

1.2.3.3 Gastritis crónica.

Cuando la colonización por *H. pylori* es persistente existe una estrecha relación entre la gastritis crónica y la secreción del ácido. Si la secreción de ácido es normal, entonces se tendrá más posibilidad de padecer gastritis a nivel del antro. En cambio, en pacientes donde la secreción de ácido se ha visto afectada los pacientes padecerán gastritis a nivel del antro y cuerpo del estómago, lo cual se conoce como pangastritis (Kuipers y cols, 1995).

1.2.3.4 Úlcera péptica.

Existen dos tipos de úlceras, que en conjunto se conocen como úlceras pépticas; la gástrica que se observa a lo largo de la curvatura menor del estómago, entre el cuerpo y el antro; la duodenal, la cual se localiza en el bulbo duodenal donde está más expuesta al ácido gástrico. Un dato interesante es la frecuencia de estas úlceras, la úlcera duodenal es mayor en personas de 20 a 50 años de edad y la úlcera gástrica en personas mayores de 40 años (Veldhuyzen y cols, 1999). En los casos de úlcera duodenal la bacteria *H. pylori* ha estado presente en un 95% y en úlcera gástrica el 85% (Kuipers et al, 1995).

1.2.3.5 Dispepsia no ulcerosa.

La dispepsia no ulcerosa se caracteriza por presentar un cuadro similar al que se observa en caso de úlcera aguda; esto es, dolor en la boca del estómago, distensión abdominal y náuseas. La diferencia radica en que no existe daño a nivel de la mucosa gástrica. Se ha establecido una relación entre este padecimiento y la presencia de *H. pylori* aunque existen estudios con resultados

encontrados, se ha visto que los pacientes tratados para eliminar a la bacteria mejoran su salud. (Kusters y cols, 2006).

1.2.3.6 Cáncer gástrico.

H. pylori ha sido clasificada como un carcinógeno Tipo I, existe suficiente evidencia documentada que relaciona la presencia de esta bacteria y el desarrollo del cáncer en el ser humano, al ser el cáncer es una enfermedad multifactorial y que depende de factores predisponentes del hospedero y de la propia bacteria; como podrían ser: factores de virulencia presente que presente la cepa bacteriana y la capacidad del paciente de producir mayor cantidad de IL, además de la alimentación y el estilo de vida lo cual favorece su desarrollo. Se estima que hasta un 5% de la personas infectadas por *H. pylori* presentarán cáncer (El-Omar y cols, 2000).

1.2.3.7 Linfoma MALT.

El linfoma de Tejido Linfoide Asociado a Mucosas, (linfoma MALT) se refiere a la proliferación de linfocitos tipo B que invade la glándula gástrica. El desarrollo del linfoma va acompañado por la colonización de *H. pylori*. Sin embargo, sólo 1% de la población infectada padecerá esta enfermedad (Parsonnet y Isaacson; 2004).

1.2.4 Factores de virulencia.

H. pylori presenta diversos factores de virulencia que le permiten colonizar, persistir y causar enfermedad, entre ellos se encuentran:

1.2.4.1 Adhesinas.

Las adhesinas son proteínas no fimbriales que le permiten a *H. pylori* anclarse a las células del epitelio gástrico, esta adhesión tiene como consecuencia que dicha célula pierda sus microvellosidades. *H. pylori* produce varias adhesinas de

membrana externa de la familia Hop, una de ellas es BabA, su presencia está ligada a factores de virulencia como CagA y ambos se observan en pacientes con úlcera péptica y cáncer gástrico (Gerhad y cols, 1999). OipA se relaciona con procesos inflamatorios donde participa la IL-8 (Yamaoka y cols, 2002). La adhesina SabA puede provocar respuesta autoinmune e inflamación crónica (Mahdavi y cols, 2002).

1.2.4.2 Citotoxina vacuolisante (VacA).

La proteína VacA es una toxina secretada por *H. pylori*, se une a la membrana plasmática de las células del epitelio gástrico y forma canales que propician la salida de nutrientes que son aprovechados por la bacteria. Sin embargo, esta toxina solo es sintetizada por el 50% de las cepas de *H. pylori* (Cover y Blaser; 1992).

1.2.4.3 Proteína CagA.

La proteína CagA esta codificada por el gen *cag* que además, codifica para el sistema de secreción Tipo IV, el cual inyecta a la proteína CagA a las células de epitelio gástrico dañando el citoesqueleto celular. Estudios han demostrado que sólo el 70% de las cepas de *H. pylori* posee el gen que codifica para esta proteína y se les conoce como CagA+. Los pacientes infectados por *H. pylori* CagA+ tienen un mayor riesgo de padecer gastritis atrófica, úlceras y cáncer gástrico (Maeda y cols, 1999).

1.2.4.3 LPS (Lipopolisacáridos).

El 80% de las cepas de *H. pylori* sintetizan LPS. Estos lipopolisacáridos son similares, estructuralmente a los antígenos de Lewis que se encuentran en la sangre humana (Aspinall y cols, 1996). Esto proporciona a *H. pylori* la capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero (Mahdavi y cols, 2003).

1.2.4.4 Ureasa.

La proteína ureasa es sintetizada por todas las bacterias *H. pylori*, representa el 10% del total de las proteínas sintetizadas por esta bacteria. Esta proteína es esencial para que se lleve a cabo la colonización porque la ureasa produce amonio a partir de la urea y el amonio neutraliza el ácido clorhídrico (HCl) del estómago, creando un microambiente alcalino, cercano a 8.0, ideal para la sobrevivencia de *H. pylori*. Además, la producción de amonio afecta la síntesis de DNA de las células gástricas, aumenta la probabilidad de infecciones virales e incrementa el riesgo de carcinogénesis en el hospedero (Megraud y cols, 1992).

1.2.4.5 Flagelos.

Los flagelos le permiten a la bacteria atravesar la mucosa gástrica y llegar al epitelio gástrico; *H. pylori* tiene de 5 a 6 flagelos, son estructuras localizadas en el polo de la bacteria, consisten de dos subunidades de proteína, FlaA y FlaB, se ha sugerido que juegan un papel en la virulencia bacteriana proporcionando movilidad y promoviendo la colonización. (Ottemann y Lowenthal; 2002).

1.2.4.6 Hemagglutininas.

H. pylori puede aglutinar eritrocitos al interactuar con las glucosaminas de los grupos sanguíneos. Algunos se expresan en células epiteliales, que indica una función adherente. La proteína con mayor capacidad hemaglutinante tiene una especificidad de receptor dada por NeuAc (ácido N-acetilneuramínico) (2-3) Gal del ácido siálico. En la bacteria *H. pylori* se identificó una proteína de 20kDa en su superficie con un receptor de ácido siálico que puede identificar a NeuAc (alfa2-3) Gal. (DeCarlo y cols, 1999) (Figura 2).

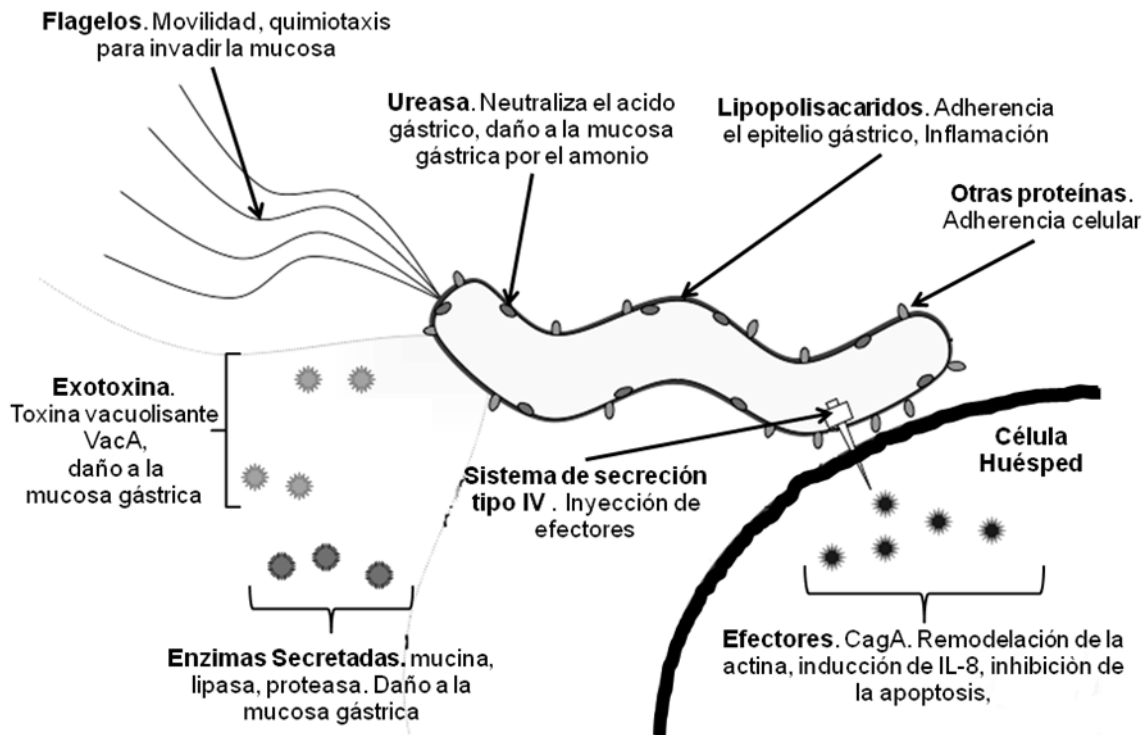


Figura 2. Factores de virulencia de *H. pylori*. La figura muestra los principales factores de virulencia de *H. pylori*, su localización y el efecto sobre la célula del hospedero (Tomado y modificado de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:H_pylori_virulence_factors_uk.png).

Para que la bacteria *H. pylori* pueda llevar a cabo su proceso invasivo y establecerse en el estómago del ser humano, requiere de nutrientes y elementos que obtiene a partir de su hospedero, uno de estos elementos es el hierro.

1.3 El hierro.

El ser humano obtiene hierro a partir de su dieta. El hierro consumido tiene dos estados: hierro libre y hierro unido a grupos hemo; ambos son absorbidos a través del tracto digestivo. El hierro libre entra en contacto con el HCl del estómago, se transforma en hierro ferroso el cual es soluble y capaz de atravesar la membrana de la mucosa intestinal. Además, este hierro puede interaccionar con el ácido ascórbico y formar un complejo que es absorbido por el intestino (Andrews y

Bridge; 1998). Cuando el hierro está unido al grupo hemo, este puede atravesar la membrana celular del epitelio gástrico (Uzel y Conrad; 1998). Una vez que el hierro ha pasado al citoplasma de la célula, este se moviliza por medio de la transferrina y se almacena en la ferritina (Baker y cols, 2003).

1.3.1 Importancia del hierro y su almacenamiento.

El hierro es un elemento muy importante para los seres vivos. Es un cofactor de las proteínas hierro azufre. Actúa como agente reductor en las reacciones de óxido-reducción en la célula. Participa en el transporte de electrones, la atracción de oxígeno, la reducción de peróxidos y la síntesis de DNA, aminoácidos y nucleótidos (Horton y cols, 2002). Sin embargo, el hierro que se encuentra de manera libre, puede generar radicales libres como $\text{OH}^\cdot$ el cual daña a los ácidos nucleicos, aminoácidos y ácidos grasos. (Wandersman y Delepelaire; 2004). En el caso de los ácidos nucleicos, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque del $\text{OH}^\cdot$ esto da lugar a la ruptura del esqueleto azúcar-fosfato, modificación de bases nitrogenadas y a la formación de uniones cruzadas (Zorrilla y cols, 2004). Con respecto a los aminoácidos, el $\text{OH}^\cdot$ genera daños puntuales de proteínas al oxidar los aminoácidos, principalmente la serina, lisina, arginina y prolina. Además las proteínas que unen metales de transición son un blanco para el ataque del radical $\text{OH}^\cdot$ (Andresen y cols, 2006). En las membranas celulares, la interacción del $\text{OH}^\cdot$ con los ácidos grasos poli-insaturados provoca daño oxidativo celular, cuya consecuencia es una menor fluidez de la membrana (Martínez; 2005). Debido a estos efectos nocivos, el hierro no puede estar libre, por lo que es almacenado. En el ser humano, el hierro se almacena en proteínas especializadas llamadas metaloproteínas, el almacenamiento se realiza por proteínas que lo unen de manera directa o a través del grupo hemo (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las metaloproteínas que unen hierro. Las metaloproteínas se pueden clasificar en dos grupos, aquellas que unen hierro y las que unen hierro a través del grupo hemo.

Metaloproteínas	
Proteínas que unen hierro libre	Proteínas que unen hierro a través del grupo hemo (hemoproteínas)
Transferrina Lactoferrina Ferritina	Hemopexina Haptoglobina Albúmina Mioglobina Catalasas Citocromos Hemoglobina

1.3.2 Proteínas que unen hierro libre.

En el ser humano se han descrito proteínas que unen hierro libre, se localizan por todo el cuerpo, por ejemplo la proteína transferrina (Tf) se localiza en el suero, se especializa en el transporte de hierro, de igual manera la lactoferrina (Lf) une y transporta hierro libre en el suero pero además lo puede reunir de las mucosas; por ultimo estas proteínas pueden llevar el hierro a la proteína ferritina (Ft) que es la proteína especializada en el almacenamiento de hierro (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas que unen hierro libre.

Proteína	kDa	Localización	Función
Transferrina	80	Suero	Transporta y protege del exceso de hierro
Lactoferrina	80	Suero y mucosas	Protege al organismo al quelar el hierro libre
Ferritina	450	Intracelular	Almacena hierro y lo pone a disposición del organismo

1.3.3 Proteínas que unen hierro a través del grupo hemo (hemoproteínas).

Por otro lado el ser humano posee proteínas que unen hierro a través del grupo hemo (hm) pero que no se especializan en el almacenamiento ni en el transporte de hierro, el hierro que contienen estas proteínas lo utilizan principalmente como un cofactor. Sin embargo, las bacterias pueden obtener hierro a partir de estas proteínas (Andrews y cols, 2003) (Tabla 3).

Tabla 3. Proteínas que unen el grupo hemo.

Proteína	kDa	Localización	Función
Hemopexina	60	Suero	Une el grupo hemo
Haptoglobina	80-160	Suero	Une Hb libre
Albúmina	67	Suero	Acarrea grupos hemo
Mioglobina	17.8	Músculo	Transporte de oxígeno
Catalasa	244	Peroxisomas	Cataliza la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2
Citocromos	Varía dependiendo del tipo de citocromo	Membrana citoplasmática, mitocondrial	Transporte de energía
Hb	68	Eritrocitos	Transporta O_2 y CO_2

Por ejemplo la hemoglobina (Hb), se especializa en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono, dicha función se basa en la capacidad de unir el oxígeno al hierro, por otro lado la Hb es la proteína que contiene la mayor cantidad de hierro unido al grupo hemo, aproximadamente 2.7 gramos lo que representa aproximadamente el 66% del hierro humano (Tabla 4).

Tabla 4. Contenido de hierro en las hemoproteínas. El hierro total encontrado en el humano y su relación con respecto al hierro total.

Proteína	Hierro (g)	% del total en el humano
Hemoglobina	2.7	66
Ferritina	1.0	30
Mioglobina	0.2	3
Transferrina	0.003	0.1
Enzimas hemo	0.0008	0.02

Las bacterias que invaden al ser humano necesitan de mecanismos para obtener hierro a partir de estas metaloproteínas.

1.3.4 La adquisición de hierro por las bacterias.

Las bacterias patógenas necesitan el hierro para llevar a cabo su proceso infeccioso (Liu y cols, 2006). Sin embargo, el poco hierro libre que no ha sido almacenado por las proteínas resulta insuficiente para que las bacterias puedan sobrevivir (Andrews y cols, 2003). Por lo tanto, las bacterias han desarrollado una serie de mecanismos a través de los cuales obtienen hierro, dichos mecanismos basan su funcionamiento en proteínas especializadas en la unión y transporte de hierro o de hierro unido al grupo hemo.

Las proteínas involucradas en la unión de hierro se clasifican en dos grupos: las que unen de manera Indirecta el hierro a través de una molécula (sideróforo) o una proteína (hemóforo) y lo transportan hacia un receptor de membrana de la bacteria. O las que lo unen de manera Directa, en este caso son proteínas de membrana (receptores) a los cuales llegan los sideróforos, hemóforos, además estos receptores pueden unir de manera directa a las hemoproteínas (Wandersman y cols, 2004, Genco y cols, 2001) (Tabla 5).

Tabla 5. Proteínas y moléculas que unen de hierro. Las bacterias unen hierro de manera directa o indirecta para lo cual emplean diferentes moléculas o proteínas.

Unen hierro de manera	Unen hierro a través de	ligando
Indirecta	Sideróforos	Hierro
	Hemóforos	Hierro-hemo
Directa	Receptores	Sideróforos
		Hemóforos
		Lactoferrina
		Ferritina
		Trasferrina
		Hemoproteínas

1.3.4.1 Sideróforos.

Son moléculas quelantes de hierro, que tienen un peso molecular menor a 1000 Da, poseen una constante de afinidad al Fe^{3+} de 10^{30} M^{-1} , son altamente electronegativos y unen preferentemente Fe^{3+} . Los sideróforos son sintetizados y secretados en respuesta a la carencia de hierro (Neilands; 1995), se conocen más de 500 sideróforos pero los mejor estudiados son la enterobactina y el ferrocromo de *E. coli* (Schalk y cols, 2004) (Figura 3).

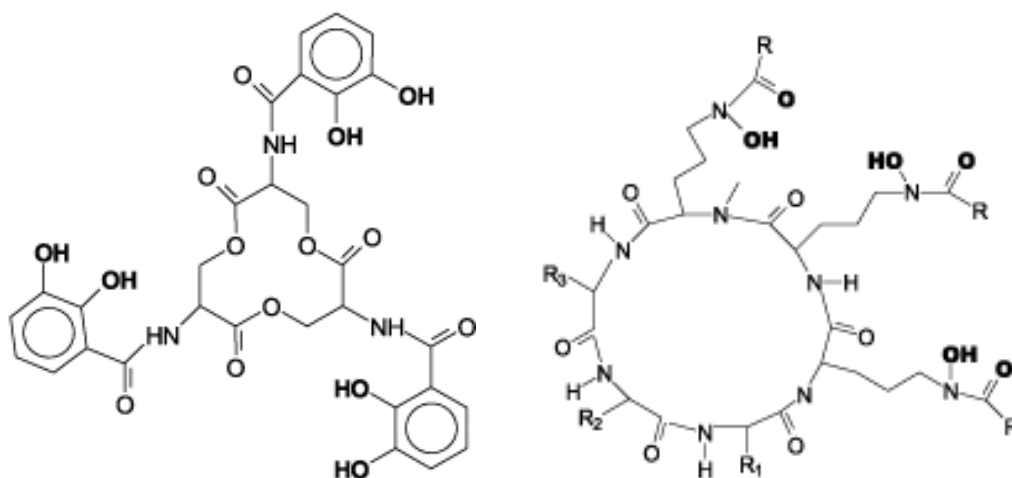


Figura 3. Estructura de la enterobactina y ferricromo. Tomado de Andrews y cols, 2002

1.3.4.2 Hemóforos.

Los hemóforos son proteínas que se localizan exclusivamente en las bacterias gram negativas y que son secretadas al medio externo. Son capaces de unir al grupo hemo de diversas fuentes como Hb o hemopexina, tienen un peso molecular aproximadamente de 10 kDa, actualmente existen cristales con los cuales ha sido posible determinar la estructura de estas proteínas como el hemóforo HasA de *Serratia marcescens* (Figura 4).

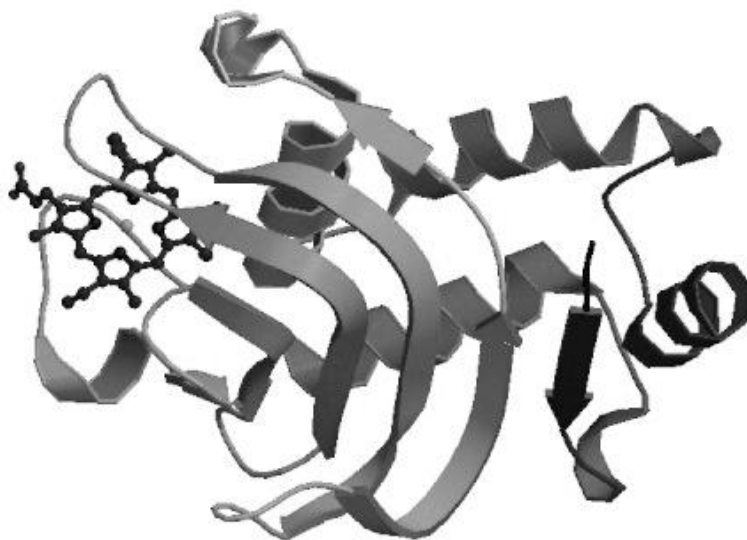


Figura 4. Estructura tridimensional resuelta por cristalografía del hemóforo HasA de *S. marcescens* unido a un grupo hemo. Tomado de Protein Data Bank 1Dk0.

1.3.4.3 Receptores.

Los receptores son proteínas de membrana cuya función es unir a los sideróforos, hemóforos o a las hemoproteínas e internalizar el hierro o grupos hemo, para llevar a cabo este proceso, los receptores necesitan de otras proteínas accesorias como el sistema TonB que le proporcionan energía y de proteínas acarreadoras tipo ABC.

1.3.4.3.1 Receptores para sideróforos.

Una vez que se ha formado el complejo sideróforo- Fe^{3+} , este es demasiado grande para pasar a través de la membrana celular o por medio de porinas, el tamaño del poro que estas proteínas tienen como límite es 600 Da. Es por ello que para internalizar este complejo se requiere de un receptor de membrana externa de alta afinidad ($K_d 10^9 \text{ M}^{-1}$) (Andrews y cols, 2003).

1.3.4.3.2 Receptores para hemóforos.

Los receptores para hemóforos se encargan de unir a los hemóforos que han unido a su estructura el grupo hemo. Por ejemplo el receptor para hemóforos de *Y. enterocolitica* (HemR), existen dos histidinas que participan en la adquisición del grupo hemo, y se ha observado que la mutación de estos residuos trae como consecuencia la incapacidad de esta proteína unir el grupo hemo (Wandersman y cols, 2004), otro ejemplo de estos receptores se ha reportado para el hemóforo ShuA, que se encarga de la adquisición de grupos hemo en la bacteria *Shigella dysenteriae* (Burkhard y Wilks; 2007).

1.3.4.3.3 Receptores para transferrina y lactoferrina.

Los receptores para transferrina y lactoferrina han sido identificados en las bacterias patógenas como *Neisseria* y *Haemophilus*. Estos receptores se localizan en la membrana externa y su expresión se induce ante la escasez de hierro. Los receptores están compuestos de dos subunidades, Tbp1 (proteína de unión a transferrina 1) y Tbp2 (proteína de unión a transferrina) para la transferrina y Lbp1 (proteína de unión a lactoferrina 1) y Lbp2 (proteína de unión a lactoferrina 2) para la lactoferrina. (Andrews y cols, 2003).

1.3.4.3.4 Receptores para el grupo hemo y hemoproteínas.

El grupo hemo es adquirido por los microorganismos patógenos mediante receptores de membrana, para posteriormente ser transportado hacia el espacio periplásmico. Este tipo de receptores se ha descrito en distintas bacterias: ChuA en *Escherichia coli*, HmuR en *Porphyromonas gingivalis*, HmbR en *Neisseria meningitidis* y HmuR en *Yersenia pestis* (Wandersman y cols, 2000) (Genco y cols, 2001).

Las proteínas receptoras de grupos hemo y hemoproteínas han sido analizadas por medio de alineamientos de sus secuencias de aminoácidos y esto ha permitido detectar motivos que se encuentran conservados a pesar de que el resto de la proteína es divergente, estos motivos se denominan FRAP y NPNL (Figura 5).

```

CHUA  432... QAFRAPTMGEMYNDISKHFSIGRFYTN  NPNLAPETNETQE
Pg_HmuR 414 LSYAIGYRAPSIQEMYFFN---HGAFFIYG-----NPDLRPEKSRML 453
Hd_HupA 686 AKYATGFRAPTSDEIYVFVQ---HPSFSIYP-----NLYLKAERRSKN 726
Hi_HhuA 755 AKYGAIFRAPTSDEIYFTFL---HPDFSIRP-----NRDLQAETTAKT 794
Vv_HupA 466 TQISIGFRAPSPNELYYTYDNPGHGYTN-----PNPNLSEKKSL 507
Vc_HutA 454 AQISIGFRAPDDELYYSFGNPAHGYVF-----PNPNLAEEDSVS 495
Sd_Shua 428 GSYAIFRAPTNSEMYNDISK---HFSIGRFY---TNYWPNPNLRPE-TNET 472
Ye_HemR 441 GSYAIFRAPTNSEMYNDISK---HFSMNIMG--NTLTNYWPNPNLRPE-TNET 488

```

Figura 5. Alineamiento de proteínas que unen Hb grupo hemo y hemoproteínas. *E. Coli* (ChuA), Pg, *P. gingivalis* (HmuR); Hd, *H. ducrey* (HupA); Hi, *H. influenzae* (HhuA); Vv, *V. vulnificus* (HupA); Vc, *V. cholerae* (HutA); Sd, *S. dysenteriae* (ShuA); Ye, *Y. enterocolitica* (Heme);. Se destacan los motivos FRAP y NPNL. Tomado de Bracken y cols, 1999.

En el receptor para Hb de *P. gingivalis* (HmuR) se ha observado que el motivo FRAP/NPNL tiene un cambio (YRAP/NPDL). Sin embargo, esta proteína conserva la capacidad de unir Hb. El cambio que se observa en el motivo FRAP de *H. ducrey*, es un cambio de fenilalanina (F) por tirosina (Y), cabe destacar que ambos aminoácidos son aromáticos, y dentro del motivo NPNL hay un cambio de asparagina (N) por el ácido aspártico (D) ambos son aminoácidos alifáticos polares (Xinyan *et al*, 2006), estos cambios al parecer conservan las características bioquímicas de los receptores y su capacidad de unir Hb.

Las regiones funcionales del receptor HmbR de *N. meningitidis* fueron identificados y se propuso un modelo hipotético para la proteína que posee regiones intracelulares, transmembranales y asas extracelulares. Para construir el modelo del receptor HmbR, se consideró. 1) La probabilidad de que los aminoácidos formaran laminas β , esto se calculó mediante el método de Schimer y Cowan. 2) Determinar que aminoácidos se conservaban entre el receptor HmbR y sus homólogos como HutA en *V. cholerae*, HgbA en *H. ducreyi* y HpuB en *N. meningitidis*, 3) Así se observaron que aminoácidos no eran conservados y 4) Se determinó que regiones podrían ser giros β con el programa PEPLOT. El modelo

que se realizó también se basó en estructuras cristalográficas de los sideroforos FepA y FhuA (Perkins-Balding y cols, 2003).

Para confirmar el modelo se realizaron mutaciones en las regiones del gen que codifican para todas las asas en las que se sustituyó por lo menos un aminoácido. Las bacterias con el plásmido mutante fueron crecidas en un medio provisto de Hb como única fuente de hierro y se encontró que las mutantes con variaciones en las asas extracelulares L6 y L7 eran incapaces de crecer en un medio que solo contenía Hb, por lo que se determinó que estas asas son importantes para la obtención de hierro a partir de Hb. También se observó que el asa L7 posee los motivos conservados FRAP y NPNL que son esenciales para la utilización de Hb (Perkins-Balding y cols, 2003) (Figura 6).

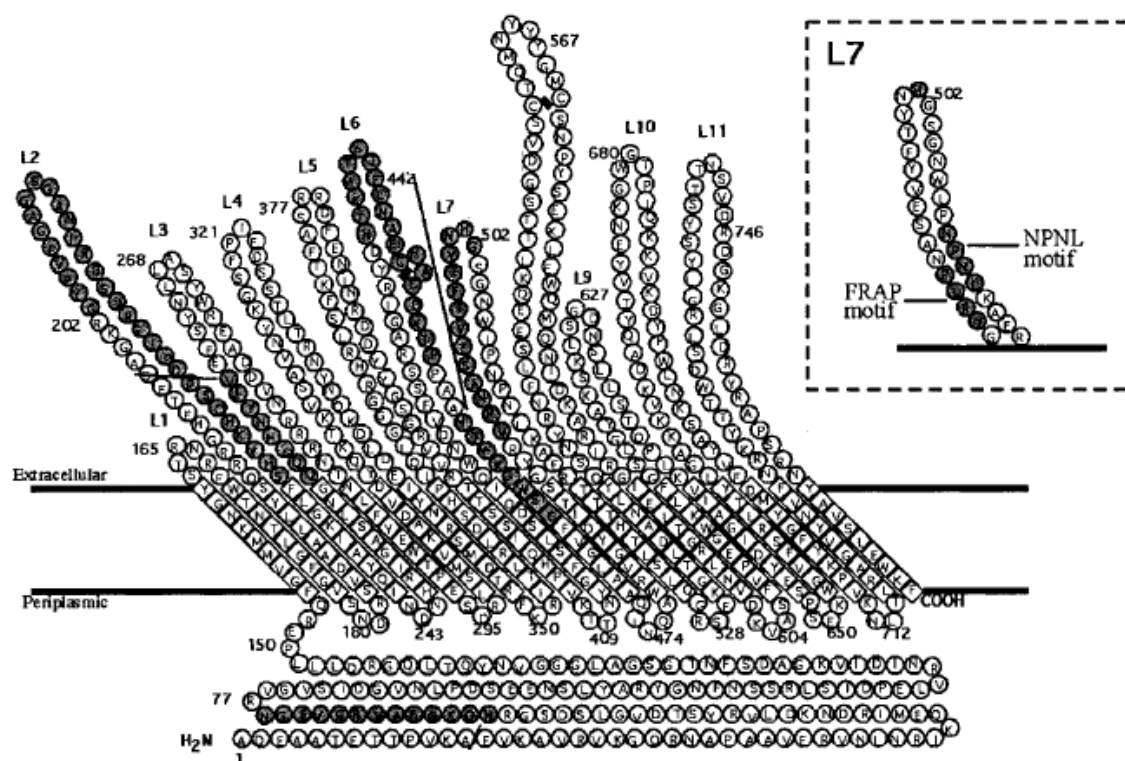


Figura 6. Modelo hipotético de un receptor de Hb HmbR de *N. meningitidis*. En el recuadro se muestra el asa 7 donde se localizan los motivos FRAP y NPNL. Tomado de Perkins-Balding y cols, 2003.

1.3.4.3.4.1 Mecanismo de acción de los receptores para grupo hemo y hemoproteínas.

La obtención de hierro a partir del grupo hemo o de una hemoproteína como la Hb, requiere de un proceso que implica, el rompimiento de células como los eritrocitos por medio de proteasas secretadas por las bacterias. (Genco y cols, 2001). La Hb liberada entonces puede ser lisada por una proteinasa, por ejemplo en *P. gingivalis* la proteinasa Kgp, es capaz de degradar Hb, hemopexina, haptoglobina y transferrina (DeCarlo y cols, 1999), en *E. coli* se ha visto que la proteína Hbp puede degradar Hb (Tame y cols, 2002).

Una vez liberada la Hb se puede unir directamente a una proteína receptora, o bien, una vez que ha sido degradada y libera el grupo hemo este se une al receptor, se ha mostrado que las bacterias solo permiten la entrada del grupo hemo y no de la Hb (Genco y cols, 2001). La unión de la Hb con su receptor debe seguir de la liberación del grupo hemo, por lo que se requiere de un cambio conformacional de la proteína receptora, el cual es dependiente de energía, la energía es proporcionada por el sistema TonB (véase más abajo) (Genco y cols, 2001). Al liberarse el grupo hemo, este pasa al espacio periplásmico y es transportado al interior de la bacteria por una permeasa tipo ABC dependiente de ATP (Fath y cols, 1993), en el interior el grupo hemo es degradado por una hemo oxigenasa a CO₂, biliverdina y hierro, por ejemplo en *C. diphtheriae* la proteína HmuO lleva a cabo esta función (Chu y cols, 1999) (Figura 7).

1.3.4.3.4.2 Sistema TonB.

La proteína TonB consta de 239 aminoácidos y actúa en conjunto con las proteínas ExbB y ExbD. Este sistema proporciona energía, en forma de ATP, a los receptores de membrana externa. El ATP producido por la bacteria es transferido a la proteína TonB, por medio de una fuerza protón motriz, que es generada por las proteínas ExbB y ExbD. La energía proporcionada por el ATP provoca que el

receptor libere su ligando hacia el espacio periplásmico (Wandersman y cols, 2004).

1.3.4.3.4.3 Transportador tipo ABC.

Una vez que el grupo hemo ha sido internalizado al espacio periplásmico, es transportado al interior de la bacteria mediante una permeasa tipo ABC, esta permeasa consta de una proteína de unión periplásmica y de un complejo de membrana interna, la cual obtiene energía a partir de ATP por medio de una ATPasa ABC (Wandersman y cols, 2004).

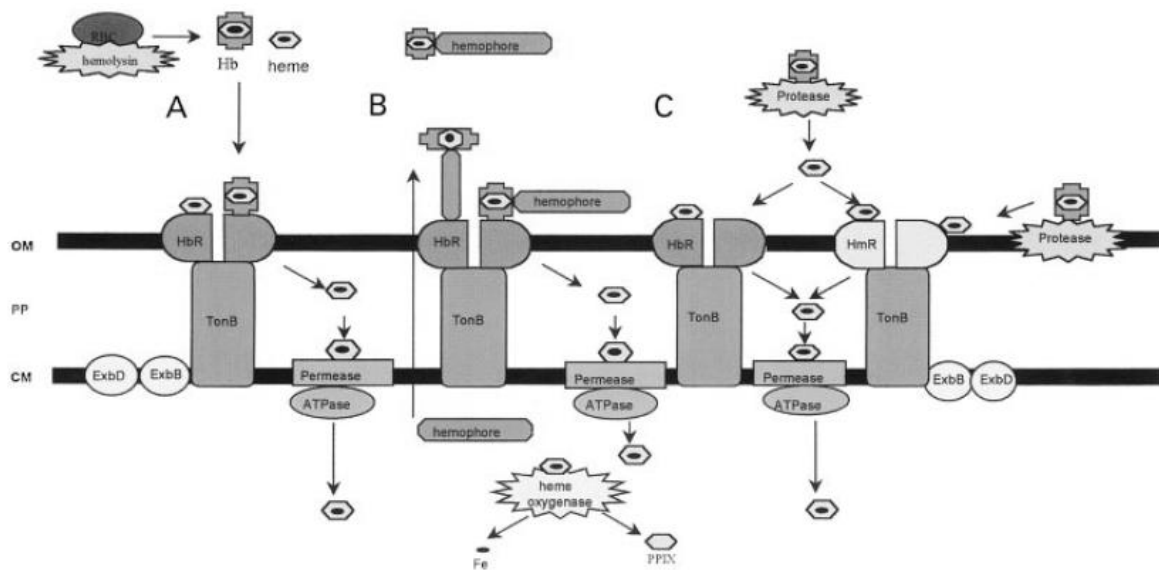


Figura 7. Esquema que representa el mecanismo de acción de receptores para hemóforos y hemoproteínas. Con la lisis de la célula roja se libera Hb y el grupo hemo. El esquema muestra el mecanismo desde la unión de la Hb o grupo hemo y como este pasa del receptor al espacio periplásmico con ayuda del sistema TonB y finalmente se internaliza por medio de una permeasa tipo ABC

- A. Se representa un receptor para Hb y grupo hemo
- B. unión del grupo hemo a través de un hemóforo
- C. unión del grupo hemo a su receptor

OM Membrana externa

PP. Espacio periplásmico

CM. Membrana citoplasmática

Tomado de Genco y cols, 2001.

Las bacterias cuentan con una gran maquinaria diseñada para la obtención de hierro a partir de su hospedero, esta maquinaria esta constituida por proteínas especializadas que pueden ser secretadas como los hemóforos o estar a nivel de membrana para unir, si se requiere, de manera directa la fuente de hierro, en el ser humano estas fuentes son las hemoproteínas (Figura 8).

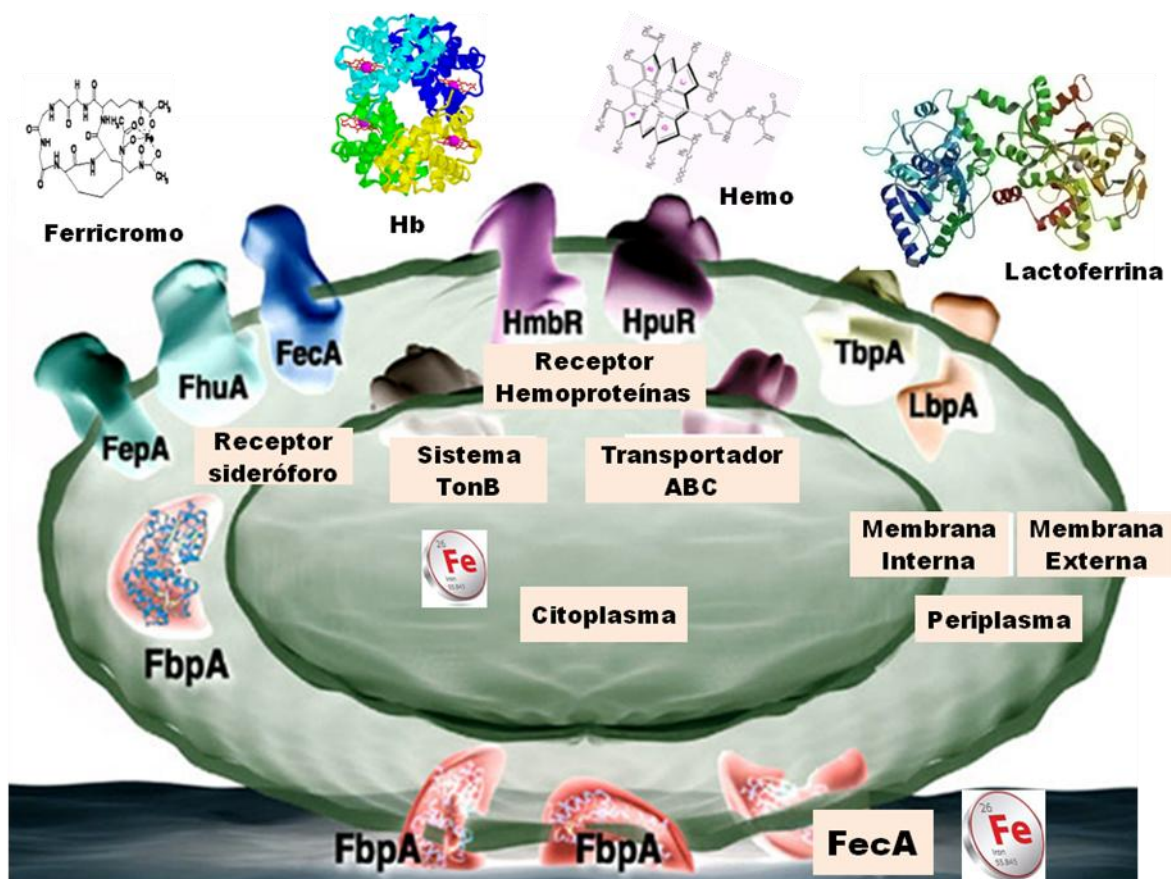


Figura 8. Representación de una bacteria Gram negativa y la obtención de hierro por diferentes vías (Tomado y modificado de Butler, 2003).

1.3.5 Método de estudio de los mecanismos de adquisición de hierro a partir de Hb.

Cuando se crecen dos bacterias de la misma especie, una patógena y no patógena, en un medio enriquecido, como el medio luria, ambas crecerán sin problemas y sí bajo esta condición se agrega un quelante de hierro como el 2-2'dipirilo, se observa que ambas bacterias dejan de crecer y con el tiempo morirán porque carecerán del hierro, el cual resulta vital para llevar a cabo sus funciones metabólicas. Sin embargo, sí bajo estas condiciones, se agrega Hb humana al medio veremos que la bacteria patógena es la única que crece. Esto se debe a que la bacteria patógena posee un mecanismo mediante el cual obtiene hierro a partir de la Hb, la información que le permite tener esta habilidad se localiza en su material genético, específicamente en las islas de patogenicidad, información de la cual carece la bacteria no patógena (González-López y Olivares-Trejo, 2009).

El grupo de Simpson y colaboradores en el 2000, determinaron en la proteína HmuR, de *P. gingivalis*, su capacidad de unir Hb y utilizarla como única fuente de hierro, realizaron pruebas *in vitro* e *in vivo*. La prueba *in vitro* consiste en determinar si la proteína HmuR es capaz de unir Hb, para ello se clonó y sobreexpresó la proteínas HmuR, en células no patógenas de *E. coli* BL21. Se separó la fracción membranal de la fracción soluble y se purificó a HmuR (Figura 9, panel A). Para determinar en qué fracción se sobre-expresa HmuR se realizó una inmunodetección, localizando a HmuR en la fracción membranal, y de igual manera se pudo identificar que la proteína purificada es HmuR. Finalmente a través del "Overlay" se determinó si HmuR une a la Hb. (Figura 9, panel B). La conclusión fue que la proteína HmuR, se localiza en la fracción membranal y puede unir Hb (Simpson y cols, 2000).

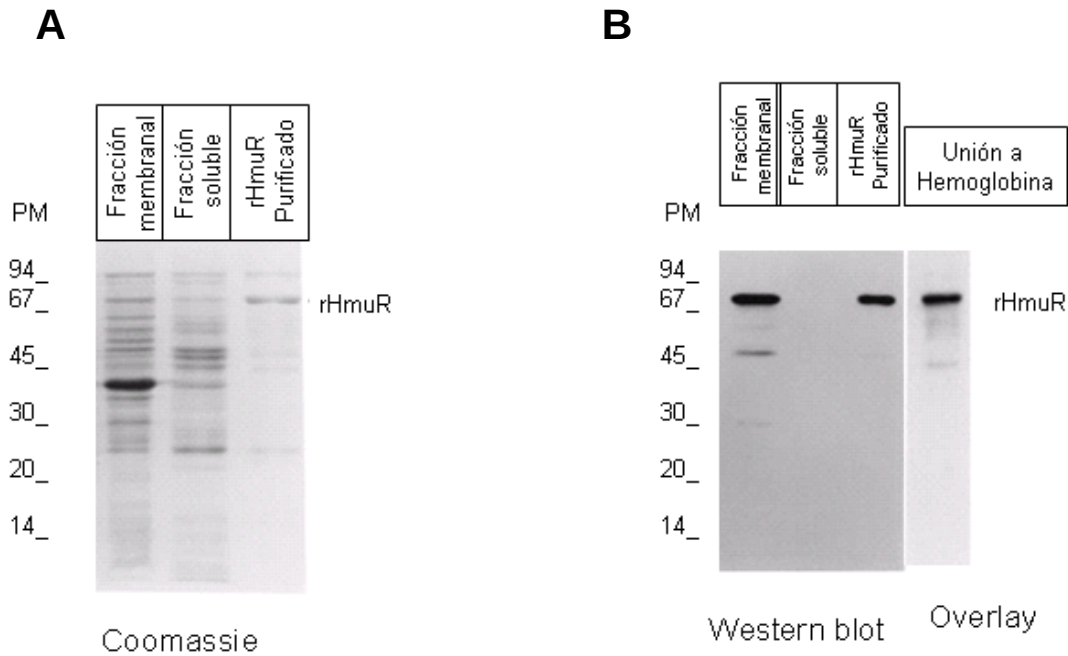


Figura 9. Proteínas de la fracción soluble y membranal de células *E. coli* transformadas y que sobreexpresan la proteína HmuR.
 Panel A Coomassie de la fracción soluble, membranal y purificación de la proteína HmuR
 Panel B Inmunodetección y Overlay de la proteína recombinante HmuR, se demuestra su localización membranal mediante la inmunodetección y su capacidad de unir Hb a través del Overlay. Tomado de Simpson y cols, 2000.

También se demostró a través de una curva de crecimiento, si la proteína era capaz de utilizar la Hb como única fuente de hierro. Las células *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido que codifica para la proteína HmuR, fueron crecidas en medio luria bajo diferentes condiciones. En la figura 10 se muestra el resultado de la curva; cuando las células transformadas crecen en medio luria, no tienen problemas para su desarrollo. Sin embargo, cuando al medio se agregó el quelante de hierro 2- 2' dipirilo las células no son capaces de presentar crecimiento, finalmente al medio con el hierro quelado se le agrega Hb, se puede apreciar que la bacteria transformada es capaz de crecer, por lo que la proteína HmuR le confiere a la célula la habilidad de obtener hierro a partir de la Hb y desarrollarse.

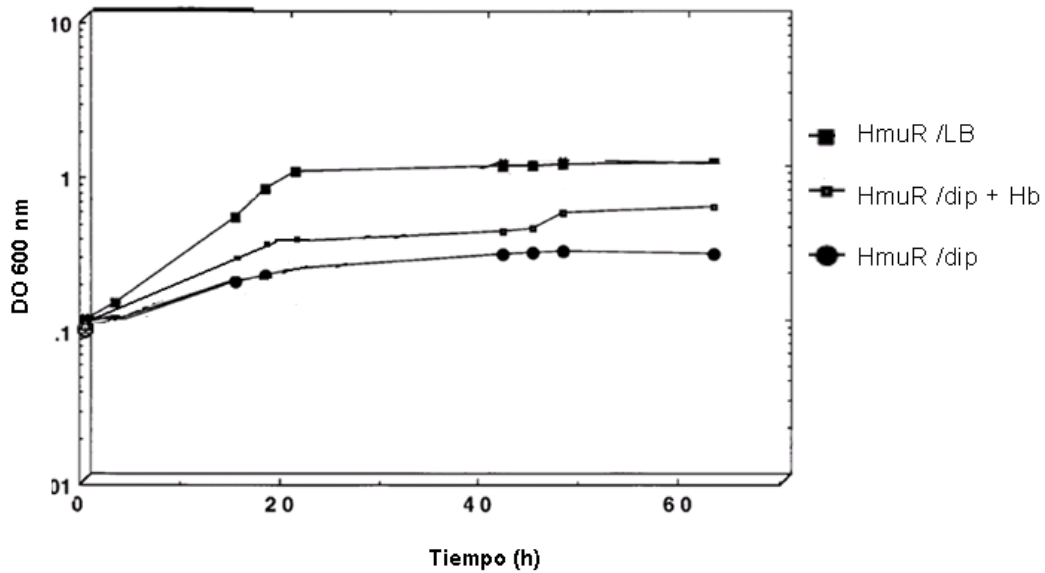


Figura 10. Curva de crecimiento. Se muestra el comportamiento de las células transformadas con el gen que codifica para la proteína HmuR, crecimiento en medio luria (LB) (■), medio luria mas 2-2' dipirilo (●) y medio luria mas quelante y Hb (▲). Tomado de Simpson y cols, 2000.

Ahora bien en nuestro grupo de trabajo nos interesa saber si la bacteria patógena *H. pylori*, cuenta con proteínas capaces de unir el hierro a través del grupo hemo y/o a partir de la Hb y si para esto hace uso de proteínas secretadas o por medio de proteínas receptoras.

2. ESTADO DEL ARTE.

2.1 ANTECEDENTES PARTICULARES.

2.1.1 Deficiencia de hierro en el hombre.

La falta de hierro afecta principalmente a la población infantil y adolescentes, debido a que se encuentran en desarrollo y su demanda de hierro es alta. Es más frecuente en países en vías de desarrollo, afectando hasta un 50% de la población infantil. Su deficiencia tiene diferentes manifestaciones clínicas como un retraso en el desarrollo físico y psicomotor, con disminución en habilidades como el lenguaje, destrezas motoras y de coordinación (Pollitt; 1991). En cuanto a la población adulta, la falta de hierro se refleja en un aumento en la mortalidad por padecimientos relacionados con la respuesta inmune, disminución en la función tiroidea y disminución de la producción de neurotransmisores como las catecolaminas (Chandra y Saraya; 1975). La falta de hierro se puede deber a diversos factores. Uno de estos es la mala absorción de este elemento y el papel de *H. pylori* en este fenómeno es importante.

2.1.2 *Helicobacter pylori* y la mal absorción de hierro en el hombre.

H. pylori coloniza el epitelio gástrico puede generar la infiltración de neutrófilos polimorfonucleares. Estos secretan lactoferrina cuya función es limitar la cantidad de hierro disponible para la bacteria. Sin embargo, esto también trae como consecuencia una baja disponibilidad de hierro para el hospedero (Weiss; 2009).

Asimismo la presencia de esta bacteria produce inflamación. Esta provoca una disminución en la producción de hepcidina (hormona relacionada con el metabolismo del hierro). Por consiguiente, macrófagos y eritrocitos no liberan hierro dando como resultado una disminución del hierro disponible para la

eritropoyesis, lo que provoca anemia en respuesta a la hipoferremia (Malyszko y Mysliwiec; 2007).

H. pylori, al colonizar las células gástricas, induce disminución de la producción de HCl, este ácido es importante para la absorción de hierro, lo convierte de su estado férrico a ferroso, que es la forma de fácil absorción. Por lo tanto, ante la falta de ácido, el hierro permanece en forma férrica y no puede ser absorbido. Asimismo, el ácido ascórbico forma un complejo con el hierro. Sin embargo, en un pH mayor a 5 no puede ser absorbido por las células (DuBois y Kearney; 2005).

2.1.3 *H. pylori* adquiere hierro a partir de su hospedero.

H. pylori requiere de hierro para colonizar y mantenerse en el estómago, se ha documentado que la bacteria puede competir por el hierro proveniente de la dieta del hospedero (Belzer y cols, 2007). Además, se ha comprobado experimentalmente que *H. pylori* obtiene hierro a partir de algunas metaloproteínas del humano como lactoferrina (Lf), transferrina (Tf), hemoglobina (Hb) e incluso del grupo hemo (hm) (Senkovich y cols, 2010).

H. pylori puede usar Lf como fuente de hierro, emplea una proteína llamada Proteína de Unión a Lactoferrina (Lbp) de aproximadamente 70kDa, se encarga de unir Lf a la membrana externa de *H. pylori* (Dhaenens y cols, 1997). Además *H. pylori* sintetiza tres proteínas de membrana externa, estas proteínas se unen al grupo hemo y poseen pesos de 48, 50 y 77 kDa pero se desconoce su identidad (Worst y cols, 1995). Adicionalmente se han identificado otras dos proteínas de membrana, FrpB1 de 88.5 kDa, que une Hb y grupo hemo (Carrizo-Chávez y cols, 2012) y FrpB2 de 90.8 kDa, que sólo une Hb (González-López y Olivares-Trejo; 2009). Estas proteínas poseen características únicas que les permiten su unión con la Hb y el grupo hemo, esto es, los motivos FRAP y NPNL (González-López y Olivares-Trejo; 2009) (Figura 11).

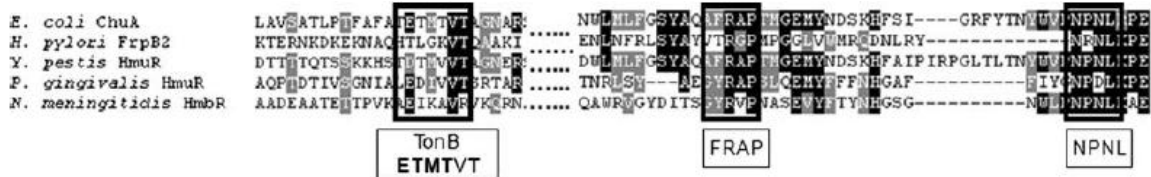
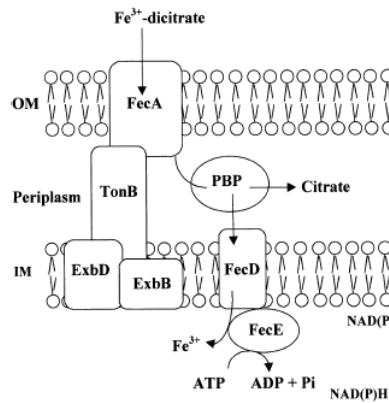


Figura 11. Alineamiento la secuencia de aminoácidos de las proteínas que unen Hb de *H. pylori* y secuencias relacionadas de otras bacterias. Se señala en un cuadro los motivos FRAP y NPNL. Tomado de González-López y Olivares-Trejo 2009.

Finalmente *H. pylori* puede asimilar hierro libre empleando el sistema FeoB, el cual cuenta con el sistema TonB (TonB, ExbD y ExbB) y las permeasas tipo ABC (FecD y FecE), que le permiten obtener hierro unido a dicitrato (Velayudhan y cols, 2000) (Figura 12), la expresión de los genes que codifican para estas proteínas se encuentran reguladas por el gen *Fur* (Bereswill y cols, 2005).



Fe-LIMITATION

Figura 12. Modelo de obtención de hierro a partir de hierro-dicitrato. *H. pylori* utiliza las proteínas TonB para proporcionar energía a este sistema, y las proteínas Fec D y Fec C que son proteínas tipo ABC, para introducir el hierro-dicitrato. Tomado de Velayudhan y cols, 2000.

3. IMPORTANCIA DE CONTINUAR CON EL TEMA.

H. pylori es una bacteria patógena que coloniza el epitelio gástrico, produciendo diversas patologías desde gastritis, úlceras incluyendo cáncer, Además durante su proceso de colonización esta bacteria requiere de hierro para realizar sus procesos biológicos, empleando varios mecanismos los cuales involucran una gran variedad de proteínas; hasta ahora, se han identificado algunas de ellas. Sin embargo, en estudios realizados en nuestro grupo de trabajo se han evidenciado la presencia de otras proteínas de membrana con capacidad de unirse al grupo hemo, que no han sido identificadas y que posiblemente participen en la adquisición de hierro, corroborando la importancia que tiene el grupo hemo para esta bacteria. Asimismo, por otro lado se desconoce si *H. pylori* tiene la capacidad de usar mecanismos indirectos para la adquisición de hierro, hasta ahora no existe evidencia de que esta bacteria sintetice proteínas tipo hemóforos para la adquisición de hierro.

II. OBJETIVOS.

1. OBJETIVO GENERAL.

- Identificar proteínas de *H. pylori* que unen hemoglobina a través del grupo hemo.

2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Purificar proteínas de *H. pylori* que se unan al grupo hemo.
- Identificar las proteínas que tienen la capacidad de unir el grupo hemo
- Analizar si las proteínas identificadas tienen la capacidad de unir otros elementos o compuestos diferentes al grupo hemo.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

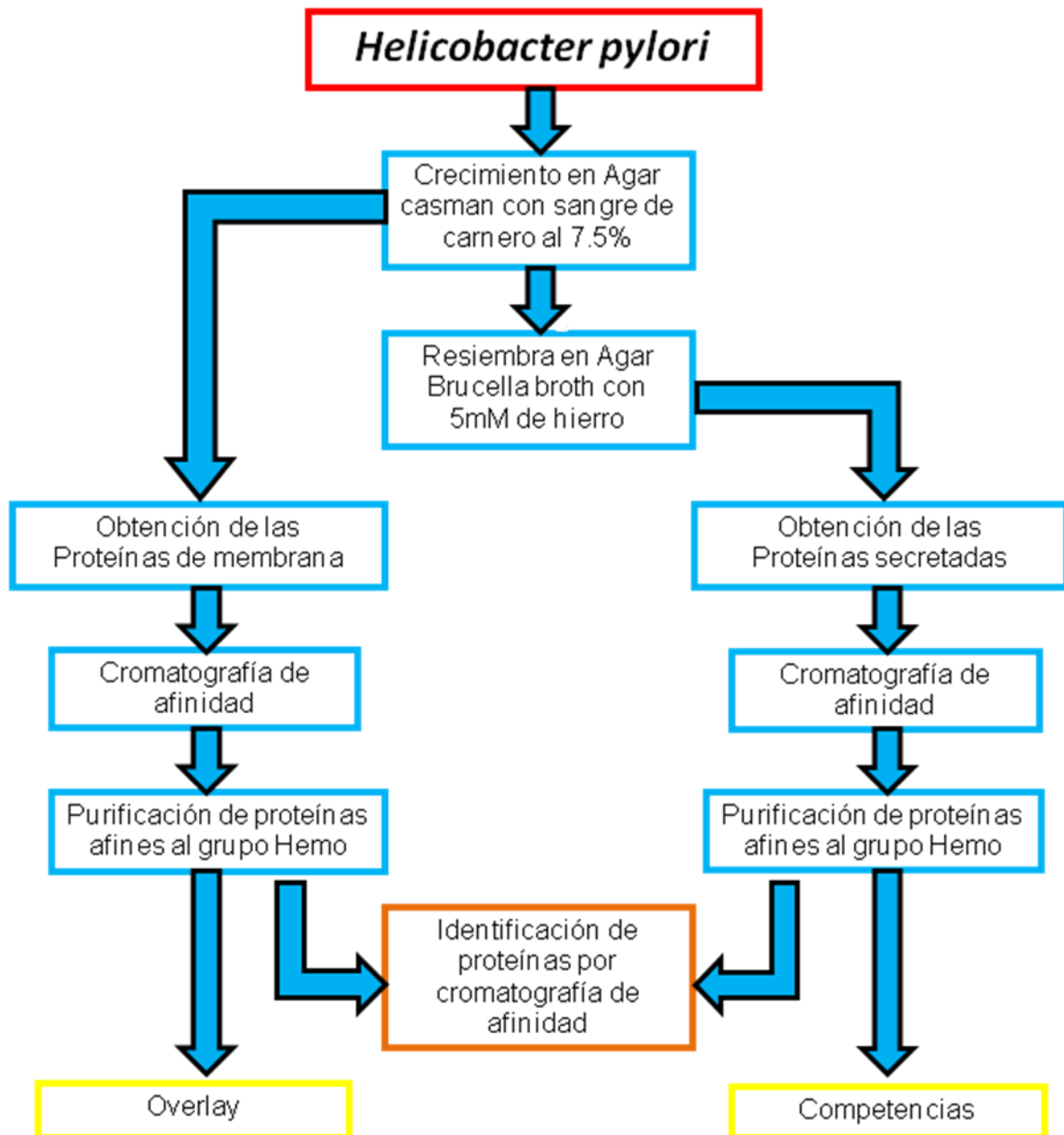


Figura 13. Estrategia experimental.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Cepas bacterianas

Se emplearon las cepas de *Helicobacter pylori* J99 (ATCC 700824) y como control la cepa *E. coli* O157:H7 (ATCC 700927).

2. Condiciones de crecimiento bacteriano.

2.1 *H. pylori*.

La cepa *H. pylori* fue rutinariamente crecida en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 7.5%, 37°C y en condiciones microaerófilas (10% CO₂) de 24 a 48 horas (h), posteriormente estas bacterias fueron resembradas en el mismo agar por 12 h para la obtención de proteínas de membrana o en agar Casman suplementado con 5mM de FeCl₃ por 12 h, cuando se obtuvieron proteínas secretadas.

2.2 *E. coli*.

La cepa de *E. coli* se mantuvo en crecimiento en agar Luria-Bertani por 12 h/ 37°C, posteriormente se resembró en medio Casman suplementado con 5mM de FeCl₃ por 12 h/ 37°C para la obtención de proteínas secretadas.

3. Identificación microscópica de *H. pylori* y *E. coli* mediante tinción de Gram.

Con el asa bacteriológica se tomó una muestra de la bacteria y se depositó sobre un portaobjetos y se fijó a la flama, se agregó una gota de cristal violeta y se dejó reposar por un minuto, se lavó con agua hasta eliminar el exceso, se adicionó una gota de lugol y se dejó por 1 minuto, se lavó con alcohol acetona hasta que la

muestra quedó limpia, se agregó una gota de safranina, reposó por un minuto se lavó con agua, se secó a temperatura ambiente y se observó al microscopio, con el objetivo de 10X se localiza una zona y con el objetivo 100X se observan detalles, en este objetivo se debe de agregar una gota de aceite de inmersión para poder observar la muestra y observar la morfología microscópica característica polimórfica de *H. pylori* y *E. coli*.

4. Pruebas bioquímicas.

4.1 Catalasa.

La catalasa es una enzima que es capaz de descomponer el H_2O_2 en H_2O y O_2 ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ²). Con un asa de plástico se tomó una muestra de la bacteria *H. pylori* y se depositó sobre un portaobjeto de vidrio, posteriormente se agregó una gota de H_2O_2 al 30%, se consideró una prueba positiva si al contacto con la muestra de bacterias el H_2O_2 desprendió burbujas.

4.2 Ureasa.

Esta prueba demuestra la presencia de la enzima ureasa de *H. pylori*, la ureasa descompone la urea en anhídrido carbónico y amoníaco, dicha reacción genera un pH alcalino que se evidencia por un cambio de color del medio de naranja-amarillo a rosa fuerte debido a la acción del indicador de pH, la reacción es la siguiente: $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3$, el procedimiento es el siguiente: con un asa de plástico se tomó una muestra de la bacteria *H. pylori* y se depositó sobre el medio con urea, se considera positiva si el medio cambia a color rosa en menos de 1 min.

5. Obtención de DNA genómico de *H. pylori*.

El DNA genómico de *H. pylori* se obtuvo mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante con las siguientes variaciones, brevemente; la bacteria se creció en agar Casman suplementado con sangre de caballo al 7.5 %, las células se resuspendieron en 1ml de solución PBS 1X y se centrifugó a 6000 g por 2 minutos (min) y se eliminó el sobrenadante. Después se adicionaron 600 µl de la solución de lisis nuclear y se resuspendió la pastilla, posteriormente se incubó a 80°C/5 min para lisar las células, se dejó enfriar a temperatura ambiente (T.A), se adicionó 3 µl de la solución RNasa, se invirtió el tubo hasta 5 veces para mezclar, esta solución se incubó a 37°C/30 min, se enfrió a T. A, se adicionó 200 µl de solución precipitadora de proteínas a la muestra tratada con la RNasa, se agitó vigorosamente con el vortex por 20 segundos (s) e incubó en hielo por 5 min, después de la precipitación de proteínas, se incubaron por 5 min en hielo, posteriormente se agregó 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, se centrifugó a 12000 g durante 3 min y se recuperó la fase acuosa que se colocó en otro tubo al cual se le agregó 600 µl de isopropanol frío y se dejó durante toda la noche (O. N) a -20°C, pasado este tiempo se centrifugó a 16000 g, se transfirió el sobrenadante, que contiene el DNA, a un tubo eppendorf de 1.5 ml el cual debía contener 600 µl de isopropanol a T. A, se mezcló por inversión hasta que las hebras de DNA fueron visibles, se retiró el sobrenadante, se centrifugó a 16000 g/ 2 min, posteriormente con cuidado se retiró y se drenó el tubo sobre papel absorbente, se adicionó 600 µl de etanol al 70 % a T. A, se invirtió el tubo varias veces para lavar la pastilla de DNA, se centrifugó a 16000 g/ 2 min, cuidadosamente se retiró, por aspiración, el etanol, la pastilla se dejó al aire por 15 min, posteriormente se adicionó 100 µl de solución rehidratante de DNA al tubo y se rehidrató el DNA por incubación a 65°C/ 1 h, periódicamente se mezcló invirtiendo el tubo, finalmente se almacenó el DNA a una temperatura de -20°C

6. Amplificación de los genes *glmM*, *cagA*, *cagE* y *vacA* por PCR

El DNA genómico obtenido se utilizó como molde para la amplificación del gen seleccionado. La reacción de PCR se llevó a cabo de la siguiente manera: para un volumen de 25 µl se puso en un tubo de PCR 2.5 µl de amortiguador 10X 0.75 µl de Mg 50mM, 2.5 µl de dNTP's 10mM, 1 µl de oligo sentido 150mM, 1 µl de oligo antisentido 150mM, 1µg/ µl de DNA, 0.5 U de enzima Taq polimerasa y se llevó a un volumen final de 25 µl con agua miliQ. Se realizó un control negativo el cual contenía todos los compuestos a excepción de DNA.

Los oligos empleados para la amplificación de los genes fueron:

Gen <i>glmM</i>	Sentido:	5` AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT 3`
	Antisentido:	5` AAGCTTACTTTCTAACAATAACGC 3`
Gen <i>cagA</i>	Sentido:	5` AATACACCAACGCCTCCAAG 3`
	Antisentido:	5` TTGTTGCCGCTTTTGCTCTC 3`
Gen <i>cagE</i>	Sentido:	5` TGTGGCAAGCAAACAAGCT 3`
	Antisentido:	5` TCAGGGAAACCAAACAACCT 3`
Gen <i>vacA</i>	Sentido:	5` ATGGAAATACAACAACACAC 3`
	Antisentido:	5` CTGCTTGAATGCGCCAAA 3`

El programa utilizado para la amplificación de los genes fueron los siguientes:

Gen *glmM*. Calentar a 94°C/ 5 min 1 ciclo; 93°C/1 min, 57°C/1 min y 72°C/1 min durante 35 ciclos y finalmente 72°C/10 min 1 ciclo.

Gen *cagA*. Calentar a 94°C/5 min 1 ciclo; 94°C/1 min, 55°C/1 min y 72°C/1 min durante 35 ciclos y finalmente 72°C/10 min 1 ciclo.

Gen *cagE*. Calentar a 94°C/5 min 1 ciclo; 94°C/1 min, 55°C/1 min y 72°C/1 min durante 35 ciclos y finalmente 72°C/10 min 1 ciclo.

Gen *vacA*. Calentar a 94°C/5 min 1 ciclo; 93°C/1 min, 53°C/1 min y 72°C/1 min durante 35 ciclos y finalmente 72°C/10 min 1 ciclo.

7. Geles de agarosa.

El DNA total y los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando amortiguador TAE y teñidos con bromuro de etidio, los geles obtenidos fueron visualizados con un transiluminador de luz UV y digitalizados por medio de un fotodocumentador.

8. Obtención de proteínas.

8.1 Proteínas Secretadas.

8.1.1 *H. pylori*.

Se obtuvo la biomasa de la bacteria al hacerla crecer en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 7.5% por 24 h, posteriormente las bacterias se resembraron en agar Casman suplementado con FeCl_3 5mM, por 12 h al cabo de este tiempo las bacterias se colectaron y resuspendieron en caldo brucella, se centrifugaron a 6000 g/10 min, el sobrenadante, que contiene las proteínas secretadas, se separó y se filtró a través de una membrana con tamaño de poro de 0.45 μ con la finalidad de eliminar bacterias que hayan podido permanecer en el sobrenadante.

8.1.2 *E. coli*.

La bacteria *E. coli* creció en agar Luria-Bertani por 12 h, posteriormente las bacterias se resembraron en agar Casman suplementado con FeCl_3 5mM, por 12 h al cabo de este tiempo las bacterias se colectaron y resuspendieron en caldo brucella, se centrifugaron a 6000 g/10 min, el sobrenadante, que contiene las proteínas secretadas, se separó y se filtró a través de una membrana con tamaño

de poro de 0.45 μ con la finalidad de eliminar bacterias que hayan podido permanecer en el sobrenadante.

8.2 Proteínas totales.

8.2.1 *H. pylori*.

H. pylori creció en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 7.5% por 24 h, posteriormente las bacterias se resembraron en agar Casman suplementado con FeCl₃ 5mM, por 12 h al cabo de este tiempo las bacterias se colectaron y resuspendieron en amortiguador de lavado Tris HCl 20mM, se lavaron por centrifugación a 6000 g/ 3 min 3 veces, posteriormente la pastilla formada se resuspendió en Tris HCl 20mM, 1% Sarkosil y PMSF 1mM, las bacterias se sonicaron con pulsos de 30 s y amplitud del 60% en un baño de hielo, posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 g/20 min con la finalidad de separar las bacterias no lisadas y cuerpos de inclusión, el sobrenadante se consideró como proteínas totales.

8.2.2 *E. coli*.

La bacteria *E. coli* creció en agar Luria-Bertani por 12 h, posteriormente las bacterias se resembraron en agar Casman suplementado con FeCl₃ 5mM, por 12 h al cabo de este tiempo las bacterias se colectaron y resuspendieron en amortiguador de lavado Tris HCl 20mM, se lavaron por centrifugación a 6000 g/ 3 min 3 veces, posteriormente la pastilla formada se resuspendió en Tris HCl 20mM, 1% Sarkosil y PMSF 1mM, las bacterias se sonicaron con pulsos de 30 s y amplitud del 60% en un baño de hielo, posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 g/20 min con la finalidad de separar las bacterias no lisadas y cuerpos de inclusión, el sobrenadante se consideró como proteínas totales.

8.3 Proteínas citoplásmicas.

8.3.1 *H. pylori*.

H. pylori creció en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 7.5% por 24 h, posteriormente las bacterias se resembraron en agar Casman suplementado con FeCl_3 5mM, por 12 h al cabo de este tiempo las bacterias se colectaron y resuspendieron en amortiguador de lavado Tris HCl 20mM, se lavaron por centrifugación a 6000 g/ 3 min 3 veces, posteriormente la pastilla formada se resuspendió en Tris HCl 20mM, 1% Sarkosil y PMSF 1mM, las bacterias se sonicaron con pulsos de 30 s y amplitud del 60% en un baño de hielo, posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 g/20 min con la finalidad de separar las bacterias no lisadas y cuerpos de inclusión, a partir del sobrenadante se obtuvieron las proteínas citoplásmicas mediante ultracentrifugación 105000 g/ 1 h/ 4°C, al termino se obtuvo un sobrenadante que se consideró contenía las proteínas citoplásmicas.

8.3.2 *E. coli*.

La bacteria *E. coli* creció en agar Luria-Bertani por 12 h, posteriormente las bacterias se resembraron en agar Casman suplementado con FeCl_3 5mM, por 12 h al cabo de este tiempo las bacterias se colectaron y resuspendieron en amortiguador de lavado Tris HCl 20mM, se lavaron por centrifugación a 6000 g/ 3 min 3 veces, posteriormente la pastilla formada se resuspendió en Tris HCl 20mM, 1% Sarkosil y PMSF 1mM, las bacterias se sonicaron con pulsos de 30 s y amplitud del 60% en un baño de hielo, posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 g/20 min con la finalidad de separar las bacterias no lisadas y cuerpos de inclusión, a partir del sobrenadante se obtuvieron las proteínas citoplásmicas mediante ultracentrifugación 105000 g/ 1 h/ 4°C, al termino se obtuvo un sobrenadante que se consideró contenía las proteínas citoplásmicas.

8.4 Proteínas de membrana.

8.4.1 *H. pylori*.

H. pylori creció en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 7.5% por 24 h, posteriormente las bacterias se resembraron nuevamente en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 7.5%, por 12 h al cabo de este tiempo las bacterias se colectaron y resuspendieron en amortiguador de lavado Tris HCl 20mM, se lavaron por centrifugación a 6000 g/ 3 min 3 veces, posteriormente la pastilla formada se resuspendió en Tris HCl 20mM, 1% Sarkosil y PMSF 1mM, las bacterias se sonicaron con pulsos de 30 s y amplitud del 60% en un baño de hielo, posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 g/20 min con la finalidad de separar las bacterias no lisadas y cuerpos de inclusión, a partir del sobrenadante se obtuvieron las proteínas de membrana mediante ultracentrifugación 105000 g/ 1 h/ 4°C, al termino se obtuvo una pastilla que se consideró contenía las proteínas de membrana, la pastilla se resuspendió en amortiguador Tris HCl 20 mM.

9. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad (resina-hemina).

Cada una de las fracciones de proteínas (secretadas, totales, citoplásmicas o de membrana) se pusieron a interactuar con la cromatografía (resina) de afinidad (Sigma), cuyo ligando es el grupo hemo. Las proteínas se pusieron a interactuar con la cromatografía O. N/ 4°C y en agitación, al cabo de este tiempo las muestras se centrifugaron a 1000 g/ 1 min, se obtuvo un sobrenadante, que contiene las proteínas que no tienen afinidad por el grupo hemo (Fracción no unida), la resina se lavó 4 veces con amortiguador de lavado pH 7.0 esto eliminó uniones inespecíficas, finalmente las proteínas que se unieron al grupo hemo se eluyeron con clorhidrato de guanidina 6M.

10. Elución de proteínas con diferentes ligandos.

Las proteínas se pusieron a interactuar con la cromatografía de afinidad O. N/ 4°C con agitación, al cabo de este tiempo las muestras se centrifugaron a 1000 g/ 1 min, se obtuvo un sobrenadante, que contiene las proteínas que no tienen afinidad por el grupo hemo, la resina se lavó 4 veces con amortiguador de lavado pH 7.0 esto eliminó uniones inespecíficas, posteriormente las proteínas se eluyeron con diferentes ligandos, se sustituyó al clorhidrato de guanidina por el grupo hemo, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , vitamina B_{12} y lactoferrina. Los ligandos contenían una concentración de dos veces mayor con respecto a la concentración del grupo hemo en la resina.

11. Eliminación de contaminantes de las proteínas.

Las proteínas eluidas contienen grandes cantidades de sal y otros contaminantes por lo que se utilizó el kit Clean up (BioRad) para eliminar los contaminantes y al mismo tiempo concentrar las proteínas, se siguieron las indicaciones del fabricante, brevemente, se tomó una alícuota de las proteínas eluidas, se adicionó 300 μl de solución de precipitante 1 y se mezclan con vortex, se reposa por 15 minutos en hielo, posteriormente se agregó 300 μl de solución precipitante 2, se mezcla y se centrifuga a 12000 g/ 5 min/ 4°C. Se eliminó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 40 μl de solución de lavado 1, se centrifugó a 12000 g/ 5 min/ 4°C, se retiró el sobrenadante, la pastilla se resuspende en 50 μl de agua estéril, se adicionó 1 ml de solución de lavado 2, que debe estar almacenada a -20°C, se adicionan 5 μl de aditivo se mezclaron por vortex y se dejó reposar por 20 min/ -20°C, se mezcló cada 10 min, posteriormente se centrifugó a 12000 g/ 5 min/ 4°C, se retira el sobrenadante y pastilla se resuspende en agua en el caso de proteínas secretadas, citoplásmicas y totales, en el caso de proteínas de membrana la pastilla se resuspendió en Tris HCl pH 7.0 20mM.

12. Determinación de la concentración de proteínas.

Las proteínas se cuantificaron por espectrofotometría empleando el método de Bradford, se generó una curva estándar con concentraciones conocidas de albumina sérica bovina y se leyó a 595 nm, la concentración de las muestras se determinó por interpolación. En primer lugar se prepararon diluciones de la albumina sérica bovina, que está a una concentración de 0.5 mg/ml, las diluciones fueron a 25, 50, 75 y 100 µg/ml. Las muestras se prepararon tomando un volumen igual o menor a 100 µL; completando los 100 µL con la solución de dilución. Posteriormente a cada tubo se agregó 1 ml del reactivo de Bradford, se mezcló y dejó reposar por 2 min. Se midió la absorbancia a 595 nm, con los datos se realizó la curva de referencia. Se leyeron las muestras y las lecturas se interpolaron en la curva de referencia y de esta manera se obtuvo la concentración.

13. Preparación de muestras para electroforesis en SDS-PAGE

Las proteínas se colocaron en un tubo de 1.5 ml se agregó amortiguador de carga 5X (250 mM Tris HCl pH 8, 50% de glicerol, 10% de SDS, 0.05% de azul de bromofenol, 2% de DTT, β-mercaptoetanol 1 mM), se mezcló por agitación y se hirvió durante 6 minutos, se dejó enfriar a T. A.

14. Resolución de proteínas en geles SDS-PAGE.

Las muestras se resolvieron en geles al 12%. La composición del gel consiste en: acrilamida/bisacrilamida (30%), 0.5 M de Tris-HCl pH 8.8, 0.1% de SDS, 10% de persulfato de amonio y 0.1% de TEMED. Se aplicó una corriente de 100 volts durante 2 horas. Se cargaron 50 µg de proteínas cuando el gel se tiñó con azul de Coomassie y en el caso de realizar tinción de plata se cargaron 5 µg de la muestra.

15. Tinción de proteínas con azul de Coomassie.

Las proteínas resueltas se visualizaron por el método de azul de Coomassie R-250. El gel fue inmerso en la solución de tinción (azul de Coomassie R-250 0.1%, metanol 50% y ácido acético glacial 10%) hasta que el gel quedó completamente azul, posteriormente se destiñó con solución destiñidora (metanol 40% y ácido acético glacial 10%) hasta que las proteínas quedaron en azul con fondo transparente.

16. Tinción de proteínas con nitrato de plata.

El gel fue inmerso en la solución de fijación O. N (etanol 40%, ácido acético glacial 5%), posteriormente el gel se lavó 2 veces con etanol al 5%/ 20 min, después se lavó tres veces con agua destilada/ 5 min; posteriormente se realizó el pretratamiento con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ al 0.02%/ 2 min, se lavó tres veces con agua destilada/ 20 s. El gel se colocó en solución de tinción (AgNO_3 0.2% y 40 μL de formaldehído al 37%)/ 30 min, al cabo de este tiempo se lavó 2 veces con agua destilada/ 20 s, las bandas se revelaron con solución de revelado (Na_2CO_3 al 3%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ al 0.0004% y 40 μL de formaldehído al 37%), el gel se agitó hasta que las bandas se evidenciaron, la reacción se paró con ácido acético glacial al 5% y el gel se conservó en agua destilada.

17. Espectrometría de masas LC-MS/MS.

Este procedimiento se realizó para conocer la identidad de las proteínas seleccionadas, a partir de un gel SDS-PAGE teñido con Coomassie se escindió la banda con un escalpelo, se lavó con agua destilada y se secó, la banda fue digerida con la enzima tripsina, posteriormente la muestra se cargó al equipo Micromass QToF I, 5 μL de la muestra digerida se inyectó en una columna PepMap C18 (0.75 μm x 15 cm) y se eluyó con acetonitrilo a un gradiente lineal de 200 nL/min, el péptido eluido fue introducido al espectrómetro de masas a través de un

New Objective PicoTip que a su vez estuvo sostenido por un New Objective adapter. Las condiciones del experimento son: voltaje capilar 1.8kV, voltaje del cono de tensión 32V, energía de colisión fija de 14eV a 50eV de acuerdo con la masa y la carga del ion. Los datos obtenidos fueron buscados en la base de datos www.matrixscience.com usando el algoritmo Mascot (Protein core facility Columbia University Medical Center, <http://www.cumc.columbia.edu/dept/protein/>).

18. Inmuno Detección.

Las proteínas resueltas en geles SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por medio de una cámara húmeda a 100mA en un amortiguador de transferencia (30mM Tris, 20% de metanol)/ 1 h, posteriormente las membranas fueron incubadas en amortiguador PBST (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ y 0.1 % tween 20) con leche semidescremada al 0.1% O. N/ 4°C. Posteriormente la membrana se lavó con PBST 2 veces, la membrana se incubó con el primer anticuerpo anti-GroEL (1:40000) o anti- β -Galactosidasa (1:50000)/ 1 h, la membrana se lavo 5 veces con PBST, se incubó el segundo anticuerpo, en ambos casos fue un anti-ratón acoplado a HRP a una dilución de 1:10000/ 1 h, al termino la membrana se lavó 5 veces con PBST, se dio un lavado final con PBS 1X con la finalidad de eliminar alguna posible interferencia con la quimioluminiscencia. Finalmente la membrana fue revelada por quimioluminiscencia. Los anticuerpo primarios empleados son específicos para la bacteria *E. coli* y presentan reacción cruzada con proteínas homologas de *H. pylori*.

19. Ensayo de Overlay.

Las proteínas resueltas en geles SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por medio de una cámara húmeda a 100 mA en un amortiguador de tranferencia (30mM Tris, 20% de metanol)/ 1 h, posteriormente las membranas se incubaron en amortiguador PBST (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2

mM KH_2PO_4 y 0.1 % tween 20) con leche semidescremada al 0.1% con la finalidad de bloquear sitios inespecíficos donde no hay proteínas, esto se hizo O. N/ 4°C. Posteriormente la membrana se lavó con PBST 2 veces. La membrana se puso a interactuar con Hb (0.1 mM) o vitamina B_{12} (1 mM)/ 1 h, la membrana se lavó 5 veces con PBST y se incubó con el primer anticuerpo anti β -globina (1:10000)/ 1 h, posteriormente la membrana se lavó 5 veces con PBST y se incubó con el 2do anticuerpo anti conejo (1:10000) unido a HRP/ 1 h, al cabo de este tiempo la membrana se lavó con PBST 5 veces y se dio un último lavado con PBS 1X, con la finalidad de eliminar alguna posible interferencia con la quimioluminiscencia, finalmente la membrana se reveló por quimioluminiscencia.

20. Alineamiento de secuencias tipo GroEL.

La secuencia de aminoácidos de proteínas GroEL de cepas de *Helicobacter* y de otras especies relacionadas se cargaron en el servidor ClustalW <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> con la finalidad de obtener el alineamiento y se empleó el programa JalWiev 2.8 para editar las los residuos de histidina y tirosina.

21. Modelaje en el espacio de proteínas.

La secuencia de aminoácidos de las proteínas seleccionadas se cargaron en el servidor <http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>, se obtuvo un archivo tipo PDB que contiene la información para generar una imagen tridimensional de la proteína, el archivo obtenido se corrió en el programa PyMol versión 0.9 y de esta manera se visualizó la proteína en tercera dimensión.

V. RESULTADOS.

1. Crecimiento bacteriano.

1.1 *E. coli*.

La bacteria *E. coli* se creció de manera rutinaria en agar Luria-Bertani por 12 h/ 37°C para obtener biomasa; con la finalidad de que las bacterias estimularan la síntesis de proteínas relacionadas con la obtención de hierro, fueron resembradas en agar Casman suplementado con FeCl₃ 5mM por 12 h/ 37°C. Las bacterias que crecieron en el medio suplementado con FeCl₃ fueron usadas para obtener proteínas secretadas, totales y citoplásmicas (Figura 14).

1.1.1 Identificación microscópica de *E. coli* mediante tinción de Gram.

A los cultivos de *E. coli* se les realizó tinción de Gram con la finalidad de observar su morfología, la cual era de forma de bacilos gram negativos y confirmar su pureza (Figura 14, A y B), de igual manera se realizó tinción de Gram al sobrenadante para confirmar que no contuviera bacterias que contaminaran a las proteínas secretadas (Figura 14 C).

1.2 *H. pylori*.

H. pylori se creció de manera rutinaria en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 7.5%, 37°C, 10% CO₂ de 24 a 48 h (Figura 15), posteriormente se resembró en agar Casman suplementado con FeCl₃ 5mM, 37°C, 10% CO₂ durante 12 h (Figura 15 E) para obtener proteínas secretadas (Figura 15 G) totales (Figura 15 H) y citoplásmicas (Figura 15 I). Por otro lado *H. pylori* fue resembrada en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 7.5%, 37°C, 10% CO₂ por 12 h (Figura C) para obtener proteínas de membrana (Figura 15 D).

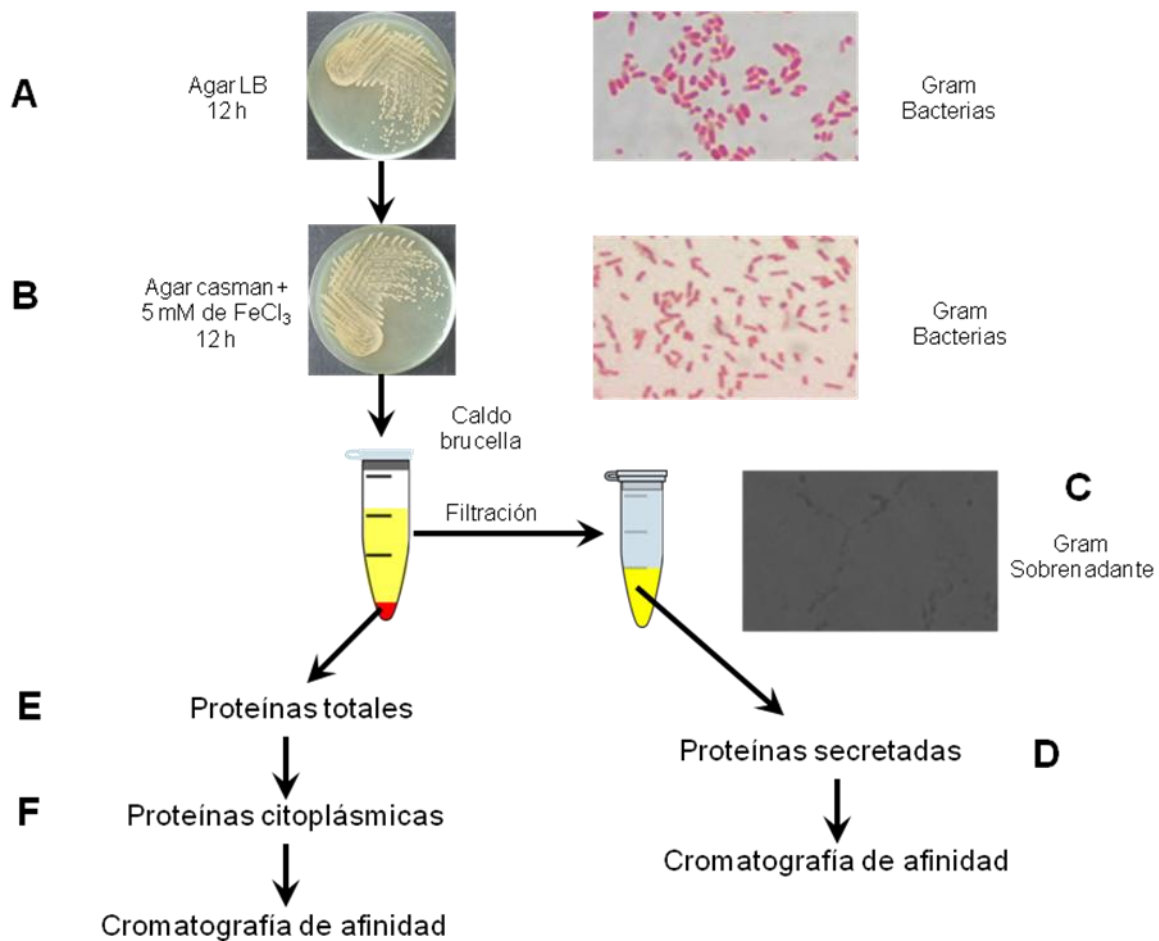


Figura 14. Monitoreo del crecimiento de *E. coli*. Durante el proceso de obtención de proteínas se realizó tinción de Gram a las bacterias crecidas en agar LB (A), agar Casman suplementado con FeCl_3 (B), al sobrenadante que contenía las proteínas secretadas (C), con la finalidad de tener cultivos puros, para posteriormente obtener proteínas secretadas (D), totales (E) y citoplásmicas (F) para la cromatografía de afinidad.

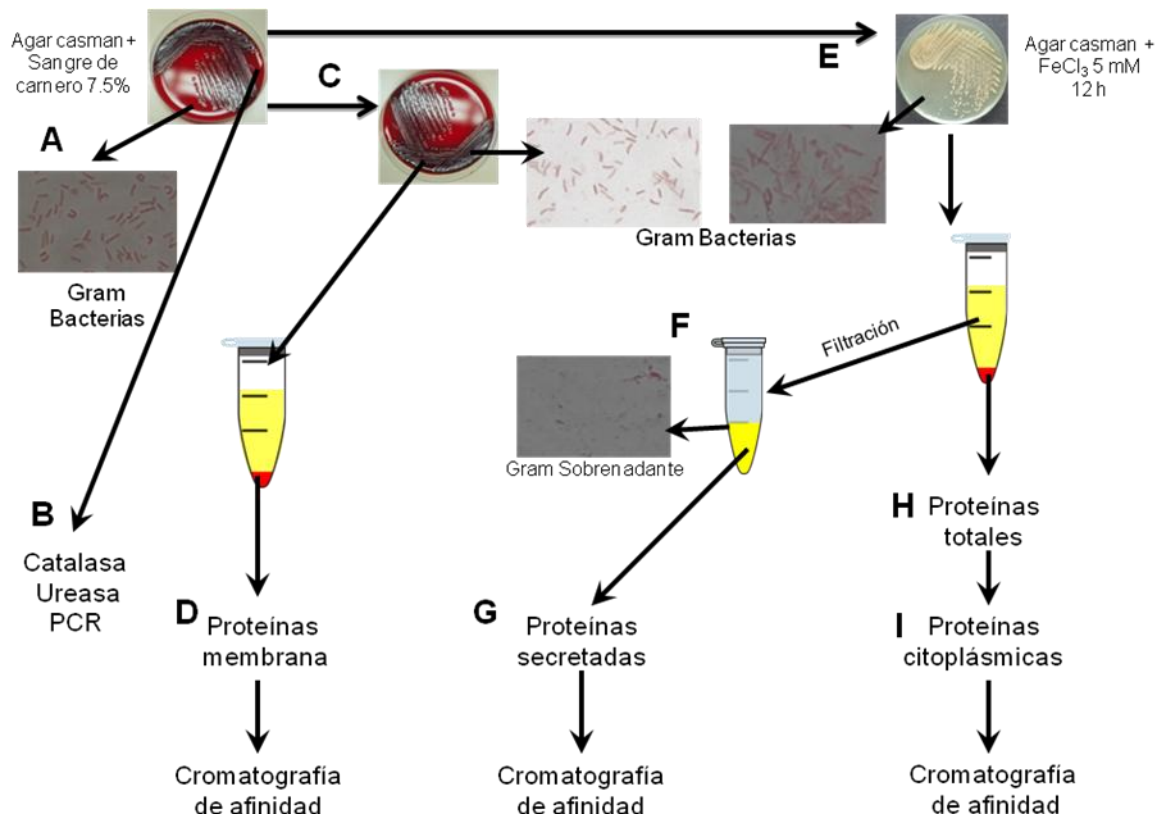


Figura 15. Monitoreo del crecimiento de *H. pylori*. Durante el proceso de obtención de proteínas se realizó tinción de Gram a las bacterias crecidas en agar Casman suplementado con sangre de carnero al 7.5% (A y C), agar Casman suplementado con FeCl_3 (E), al sobrenadante que contenía las proteínas secretadas (F), con la finalidad de tener cultivos puros, para posteriormente obtener proteínas de membrana (D), secretadas (G), totales (E) y citoplásmicas (I) para la cromatografía de afinidad.

1.2.1 Identificación microscópica de *H. pylori* mediante tinción de Gram.

Los cultivos de la bacteria *H. pylori* fueron monitoreados mediante tinción de Gram con la finalidad de observar su pureza y morfología de bacilo gram negativo (Figura 15 A, C y E). Por otro lado también se realizó tinción de Gram al sobrenadante, de esta manera se confirmó la ausencia de bacterias que pudieron contaminar la muestra de proteínas secretadas (Figura 15, F).

2. Pruebas bioquímicas.

2.1 Catalasa y ureasa.

H. pylori es una bacteria que cuenta con las enzimas catalasa y ureasa, la presencia de estas enzimas se evidenció mediante la prueba de la catalasa y ureasa, la bacteria dio un resultado positivo para ambas pruebas (Bauerfeind y cols, 1997).

3. Amplificación de los genes *glmM*, *cagA*, *cagE* y *vacA* por PCR.

El DNA genómico de *H. pylori* se usó como molde para obtener por PCR la amplificación de los genes *glmM* (294 pb), *cagA* (400 pb), *cagE* (195 pb) y *vacA* (209 pb) que son específicos de *H. pylori* (Figura 16), con esta prueba se tiene mayor evidencia de que la bacteria con la que se trabaja es *H. pylori*.

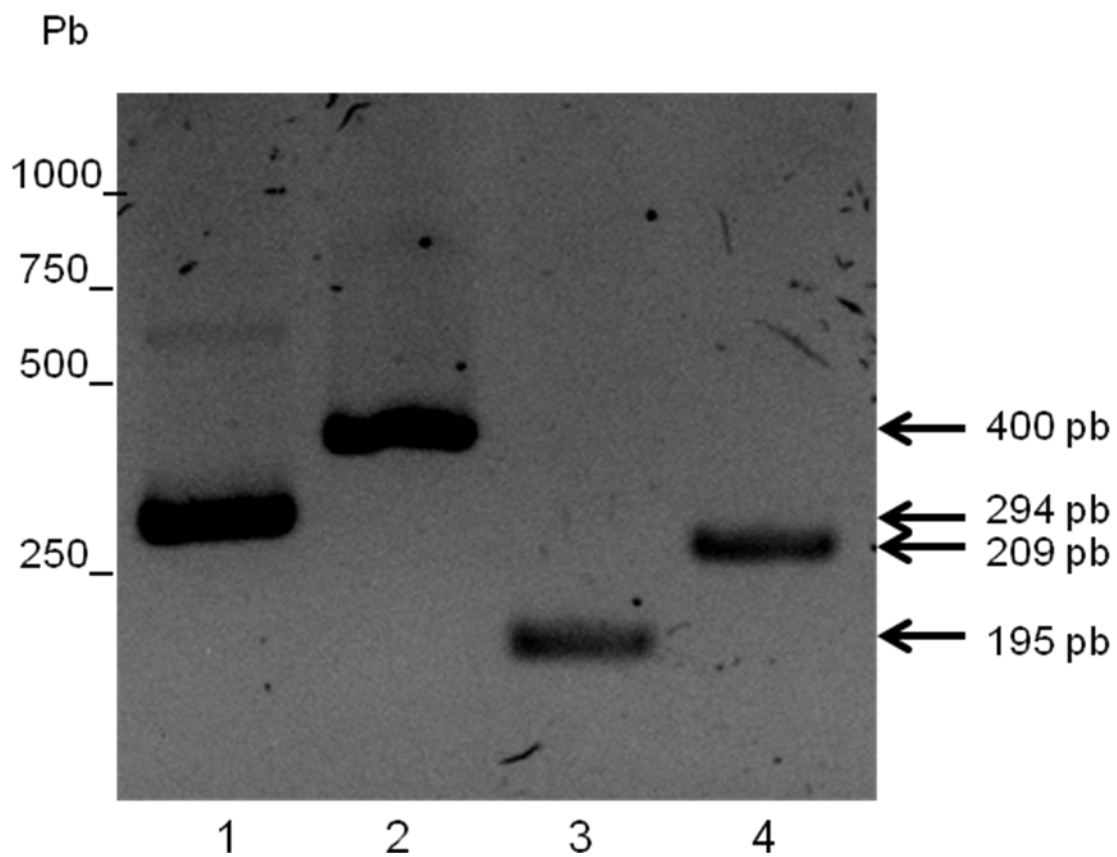


Figura 16. Amplificación por PCR de genes los *glmM*, *cagA*, *cagE* y *vacA* de *H. pylori*. Carril 1 amplicón del gen *glmM* (294 pb). Carril 2 amplicón del gen *cagA* (400 pb). Carril 3 amplicón del gen *cagE* (195 pb), carril 4 amplicón del gen *vacA* (209 pb). Las flechas indican los diferentes amplicados y sus tamaños en pb. A la izquierda se muestra el marcador de pares de bases de referencia.

4. Proteínas de los agares de cultivo purificadas por cromatografía de afinidad.

Con la finalidad de determinar si los agares de cultivo poseen proteínas afines a la cromatografía de afinidad y que durante el proceso de purificación pudieran mezclarse con las proteínas secretadas por la bacteria, ya que estas se liberan hacia el agar, se llevo a cabo la cromatografía de afinidad con el agar Casman suplementado con sangre de carnero al 7.5%, se tomó una muestra (Figura 17, Carril 1) y se puso a interactuar en la cromatografía de afinidad cuyo ligando es el grupo hemo (resina) O. N/ 4°C y agitación, al cabo de este tiempo la resina se centrifugó a 1000 g/ 1 min/ 4°C y se separó el sobrenadante, el cual contenía la proteínas que no son afines al grupo hemo (Figura 17, Carril 2), se realizaron 4 lavados con amortiguador de lavado para separar aquellas proteínas que se unieron de manera inespecífica al ligando (Figura 17, Carriles 3-6), finalmente las proteínas afines al grupo hemo fueron eluidas con una solución de clorhidrato de guanidina 6M (Figura 17, Carril 7). El resultado nos muestra que el agar Casman suplementado con sangre de carnero al 7.5% contiene una proteína de aproximadamente 50 kDa que es afín al grupo hemo (Figura 17, Carril 7), por lo tanto este agar no fue adecuado para investigar las proteínas secretadas, debido a que la proteína de 50 kDa del agar podría confundirse con las proteínas secretadas por las bacterias *H. pylori* y *E. coli*.

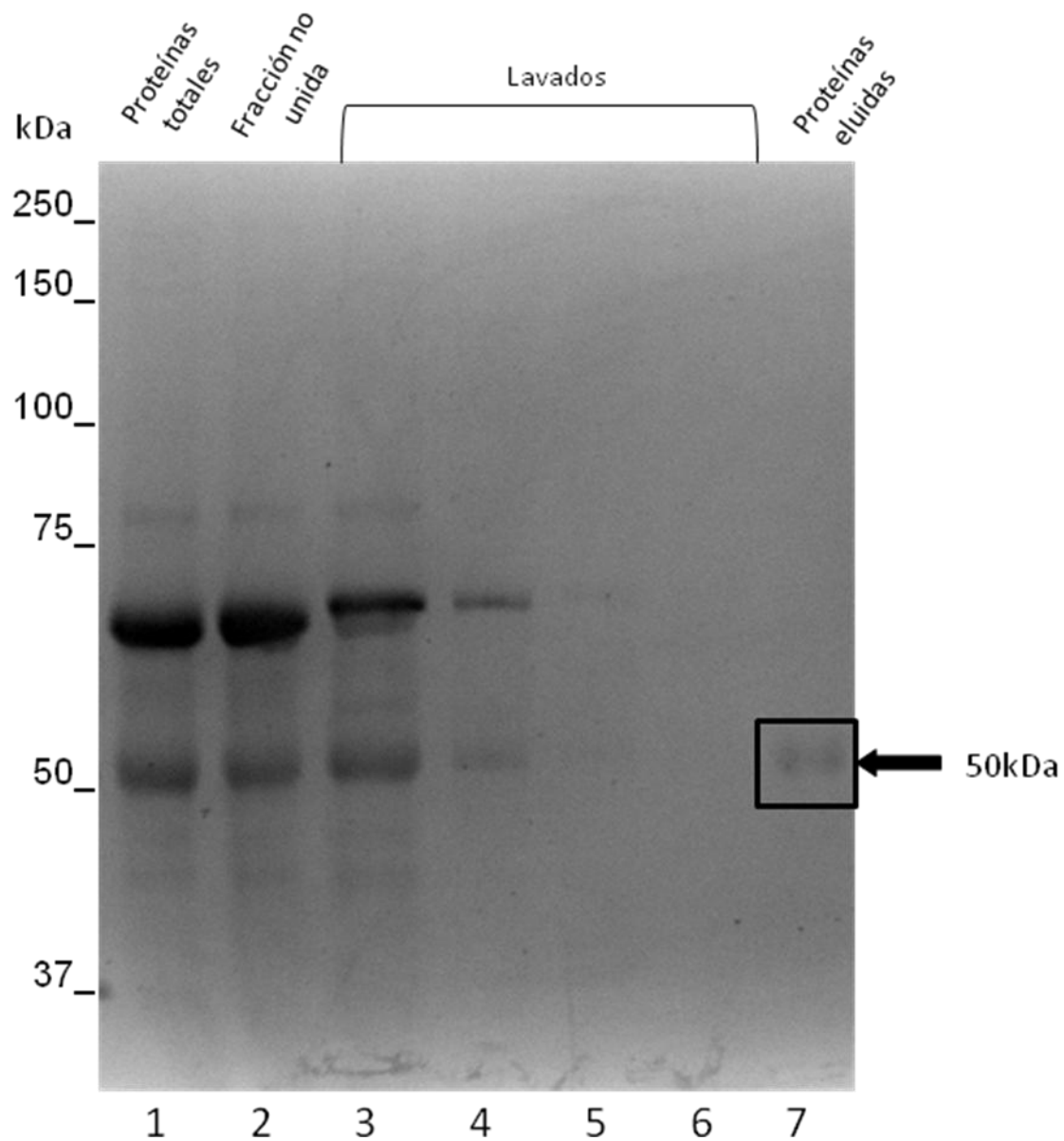


Figura 17. Proteínas del agar Casman (suplementado con sangre) que se unen a la cromatografía de afinidad. Se muestra en un recuadro la proteína eluida de aproximadamente 50 kDa, señalada con una flecha. Carril 1 Proteínas totales, Carril 2 Fracción no unida, Carriles 3-6 lavados, Carril 7 Proteína eluida. A la izquierda están los pesos moleculares de referencia. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie.

Por otro lado la cromatografía de afinidad también se aplicó al agar Casman suplementado con FeCl_3 5mM. Sin embargo, no pudimos evidenciar la presencia de proteínas en este agar (Figura 18, Carril 1), de igual manera no se encontraron proteínas con unión inespecífica a la resina (Figura 18, Carril 2, lavados (Figura 18, Carriles 3-6) y elución (Figura 18, Carril 7); por lo tanto, se decidió utilizar este agar para cultivar a la bacteria *H. pylori* y *E. coli* para obtener proteínas secretadas, con la seguridad de que las proteínas purificadas son de la bacteria. Por lo tanto, se decidió crecer de manera rutinaria a *H. pylori* en agar Casman suplementado con sangre de carnero 7.5% y resembrarla en agar Casman FeCl_3 5mM para obtener proteínas secretadas, totales y citoplásmicas, cuando el objetivo fue obtener proteínas de membrana de *H. pylori* esta creció en agar Casman suplementado con sangre de carnero 7.5% (Figura 15). *E. coli* se creció de manera rutinaria en agar Luria-Bertani y se resembró en agar Casman suplementado con FeCl_3 5mM para obtener proteínas secretadas, totales y citoplásmicas (Figura 14).

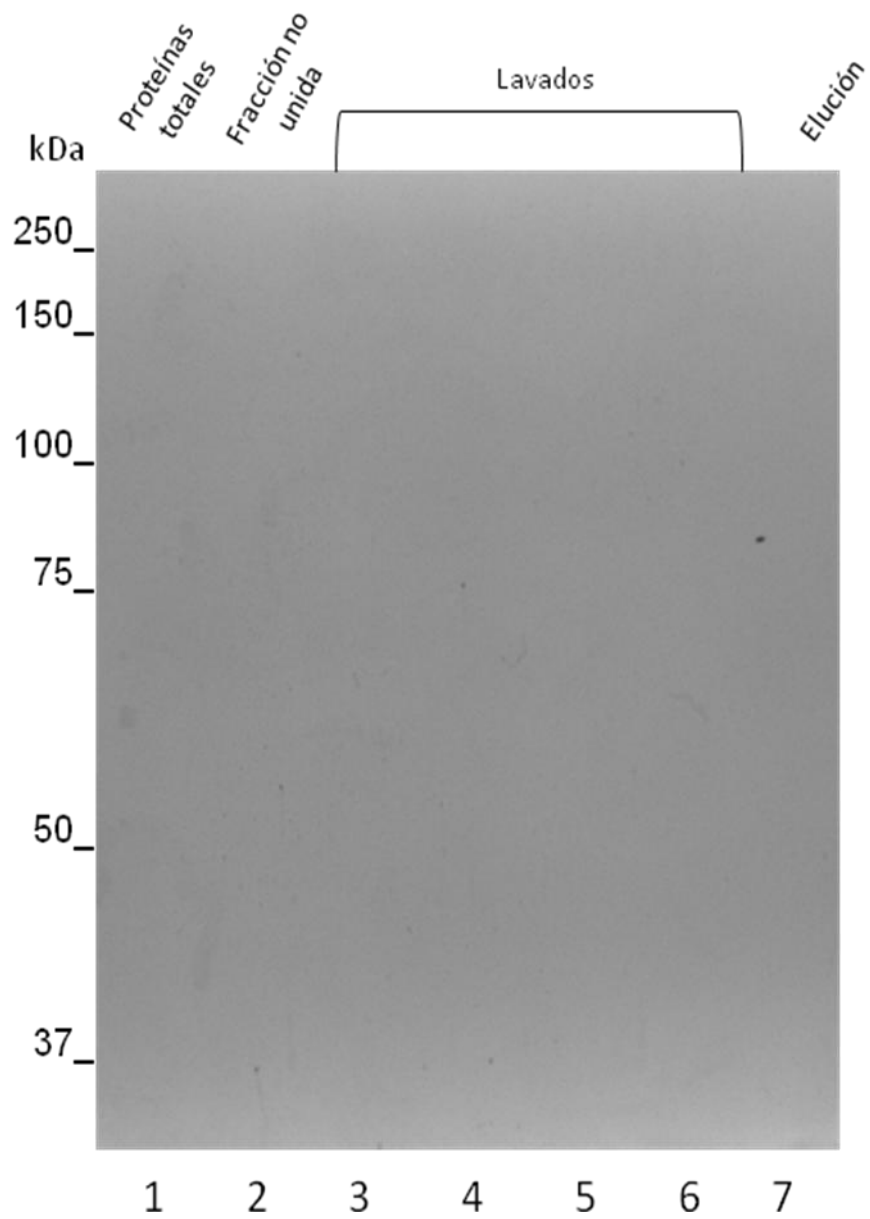


Figura 18. El agar Casman suplementado con FeCl_3 5mM no contiene proteínas afines al grupo hemo. Extractos. Carril 1 Proteínas totales, Carril 2 Fracción no unida, Carriles 3-6 Lavados, Carril 7 Elución. A la izquierda se muestran los pesos moleculares de referencia. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie.

5. Proteínas de membrana de *H. pylori* purificadas por Cromatografía de afinidad.

H. pylori se cultivó en agar Casman suplementado con sangre de carnero al 7.5% para obtener proteínas de membrana, el objetivo es estimular la expresión de proteínas relacionadas con la unión de Hb. Las proteínas de membrana (Figura 19, Carril 1) se pusieron a interactuar con la cromatografía de afinidad, se separaron las proteínas que no son afines al grupo hemo (Figura 19, Carril 2), la resina se lavó 5 veces con amortiguador de lavado, con la finalidad de separar aquellas proteínas que se unieron al grupo hemo de manera inespecífica (Figura 19, Carriles 3-7), finalmente las proteínas afines al grupo hemo fueron eluidas con clorhidrato de guanidina 6M (Figura 19, Carril 8).

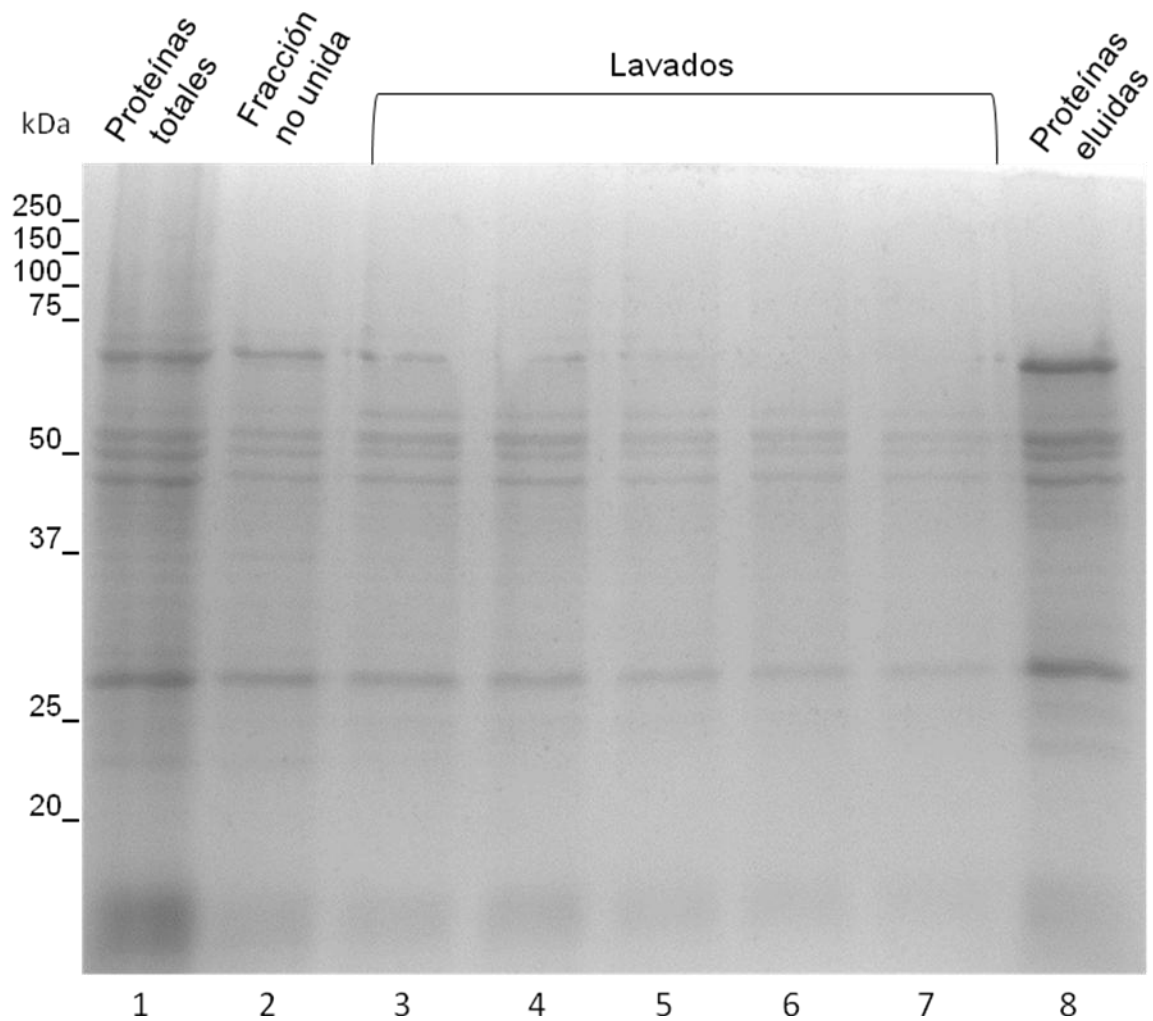


Figura 19. Proteínas de membrana de *H. pylori* afines al grupo hemo. Extractos obtenidos de la cromatografía de afinidad al poner a interactuar las proteínas de membrana de *H. pylori*. Carril 1 Proteínas totales, Carril 2 Fracción no unida, Carriles 3-7 lavados, Carril 8 Proteínas eluidas. A la izquierda se muestran los pesos moleculares de referencia. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie

Un total de 8 proteínas de membrana de *H. pylori* fueron purificadas por cromatografía de afinidad, estas proteínas tienen pesos moleculares que van de los 22 kDa hasta los 90 kDa (Figura 20).

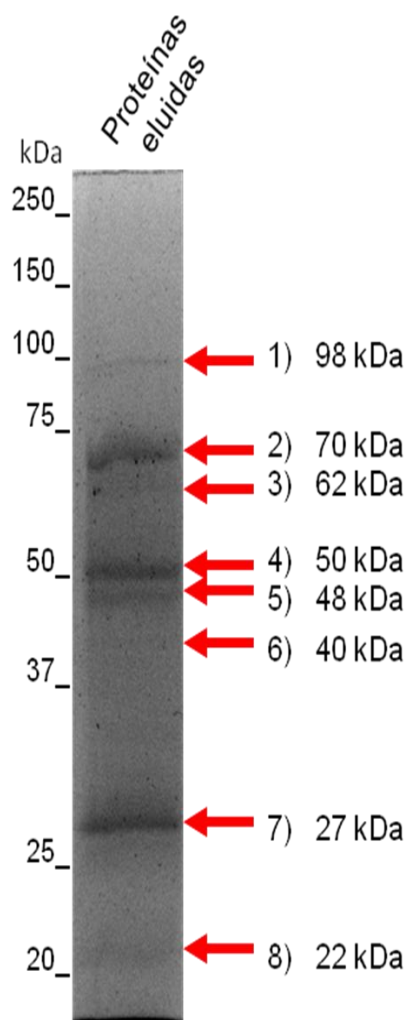


Figura 20. 8 proteínas de membrana de *H. pylori* son afines al grupo hemo. Se muestran y señalan con una flecha, las proteínas que fueron eluidas de la cromatografía de afinidad, se ponen los pesos moleculares aproximados de cada proteína, a la izquierda están los pesos moleculares de referencia. SDS-PAGE 12% azul de teñido con Coomassie.

6. Identificación por espectrometría de masas de las proteínas de membrana purificadas por cromatografía de afinidad de *H. pylori*.

Las 8 proteínas de membrana purificadas por cromatografía de afinidad (Figura 20), fueron escindidas del gel SDS-PAGE y tratadas con tripsina para su identificación por espectrometría de masas (Tabla 6). FrpB3 fue una de las proteínas identificadas (proteína de membrana externa regulada por hierro), FrpB3 forma parte, junto FrpB1 y FrpB2, de una familia de proteínas especializadas en la adquisición de hierro a partir de diferentes hemoproteínas. Por otro lado se identificó a la proteína factor de elongación Tu, de 43.7 kDa, que está relacionada con la maquinaria de síntesis de proteínas, otra proteína identificada fue la citocromo C peroxidasa, de 38.7 kDa, relacionada con la cadena respiratoria, la proteína UPF0174, de 28.4 kDa, de la cual no se sabe mucho pero se cree participa durante el choque térmico y la proteína peroxidasa, de 22.3 kDa, que tiene un papel importante durante el estrés oxidativo. El resto de las proteínas (Q9N38, Q9ZK39 y Q9ZM80) son hipotéticas pero guardan homología con proteínas de membrana externa.

Tabla 6. Proteínas de *H. pylori* identificadas por espectrometría de masas.

Número de acceso Swiss Prot	Proteína	Cobertura	Masa (kDa/pi)	Mascot score	Péptidos únicos	Función
1) Q9ZJA8	FrpB3	16%	97.49/9.05	694	19	Proteína hipotética de membrana externa regulada por hierro
2) Q9ZN38	Jhp_0021	24%	77.95/9.16	829	20	Proteína hipotética de membrana externa
3) Q9ZK39	Jhp_1103	20%	69.54/9.18	547	11	Proteína hipotética de membrana externa
4) Q9ZM80	Jhp_0342	9%	53.00/9.48	193	4	Proteína hipotética de membrana externa
5) Q9ZK19	Jhp_1128	24%	43.7/5.17	427	10	Factor de elongación Tu
6) Q9ZJF8	Jhp_1354	9%	38.7/9.13	141	9	Hipotética Citocromo C peroxidasa
7) Q9ZJ24	Jhp_1494	18%	28.4/5.32	213	6	Proteína UPF0174
8) P56876	Jhp_1471	19%	22.35/5.98	203	6	Probable peroxiredosina

7. Proteínas de membrana de *H. pylori* purificadas por cromatografía de afinidad que además de unir el grupo hemo unen Hb.

Por medio de la espectrometría de masas identificamos las proteínas de membrana de *H. pylori* que unen el grupo hemo. Sin embargo uno de nuestros objetivos es identificar proteínas de membrana que unen Hb, por lo tanto, se procedió a realizar un ensayo Overlay con Hb. Las proteínas de membrana que fueron purificadas por cromatografía de afinidad se resolvieron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la membrana fue bloqueada con leche para posteriormente incubarla con Hb, la unión de las proteínas de membrana con la Hb fue evidenciada mediante el uso del anticuerpo anti-subunidad β de la Hb, de esta manera se encontró que la proteína de 77.95 kDa (Q9ZN38 Proteína hipotética de membrana externa), 53 kDa (Q9ZM80 Proteína hipotética de membrana externa), 43.7 kDa (Q9ZK19 Factor de elongación Tu), 38.7 kDa (Q9ZJF8 Hipotética Citocromo C peroxidasa), 28.4 kDa (Q9ZJ24 Proteína UPF0174) y 22.35 kDa (P56876 Probable peroxiredoxina) tienen la capacidad de unir tanto el grupo hemo como Hb (Figura 21, carril 2).

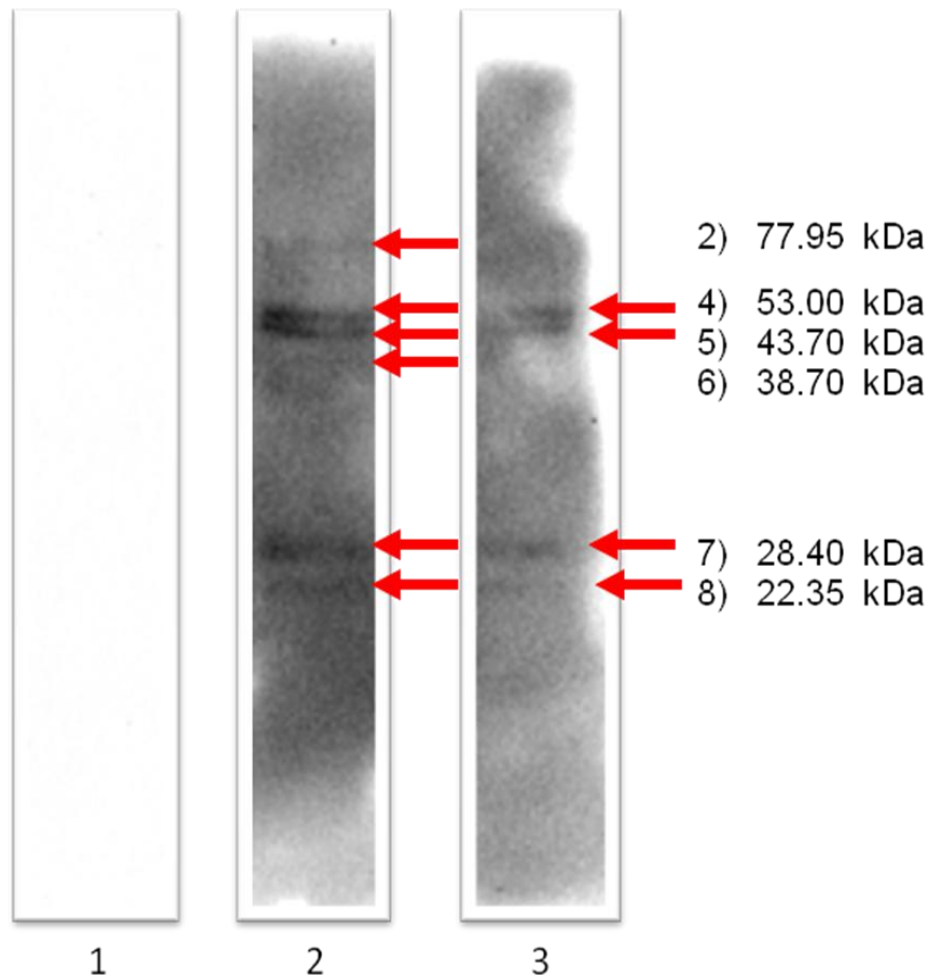


Figura 21. Overlay, algunas proteínas de membrana de *H. pylori* tienen la capacidad de unir el grupo hemo, Hb o Vitamina B₁₂. Las proteínas de membrana de *H. pylori* fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para realizar la técnica de Overlay. Control negativos solo fue incubado con PBS 1X (Carril 1). Las proteínas fueron incubadas con Hb para identificar aquellas que son capaces de unirse a esta metaloproteína (Carril 2), las proteínas se incubaron primero con el competidor, Vitamina B₁₂, para posteriormente incubarlas con Hb (Carril 3). Las proteínas fueron evidenciadas por quimioluminiscencia y son señaladas con flechas.

8. La vitamina B₁₂ compite con la Hb por la unión a las proteínas de membrana de *H. pylori* purificadas por cromatografía de afinidad.

Con la finalidad de determinar si un compuesto estructuralmente similar al grupo hemo, que forma parte de la estructura de la proteína Hb (Figura 22), es capaz de unirse a las proteínas purificadas, se procedió a hacer una competencia usando vitamina B₁₂, estructuralmente la vitamina B₁₂ y el grupo hemo son similares y ambos poseen un anillo tetrapirrólico, la diferencia radica en que el grupo hemo une un átomo de hierro y la Vitamina B₁₂ une un átomo de cobalto (Figura 22). Las proteínas de membrana de *H. pylori* que se unieron a la cromatografía de afinidad fueron resueltas en un gel SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó con leche, posteriormente se incubó con vitamina B₁₂, la membrana se lavó y se incubó con Hb, la unión de entre Hb y las proteínas de membrana se evidenció con el anticuerpo anti-subunidad β de la Hb, las proteínas que unieron en primera instancia vitamina B₁₂ no pudieron unir posteriormente Hb, de las 6 proteínas que se demostró unen Hb (Figura 21, carril 2), tras la competencia, solo 4 proteínas fueron identificadas (Figura 21, Carril 3), la proteína de 53 kDa (Q9ZM80 Proteína hipotética de membrana externa), la proteína de 43.7 kDa (Q9ZK19 Factor de elongación Tu), la proteína de 28.4 kDa (Q9ZJ24 Proteína UPF0174) y 22.35 kDa (P56876 Probable peroxiredosina). Las proteínas que no fueron evidenciadas fueron: la proteína de 77.95 kDa (Q9ZN38 Proteína hipotética de membrana externa) y la proteína de 38.7 kDa (Q9ZJF8 Hipotética Citocromo C peroxidasa), este procedimiento sugiere que estas proteínas unieron la vitamina B₁₂ y por lo tanto no fueron capaces de unir la Hb. Como control negativo una membrana fue incubada solamente con PBS 1X (Figura 21, Carril 1).

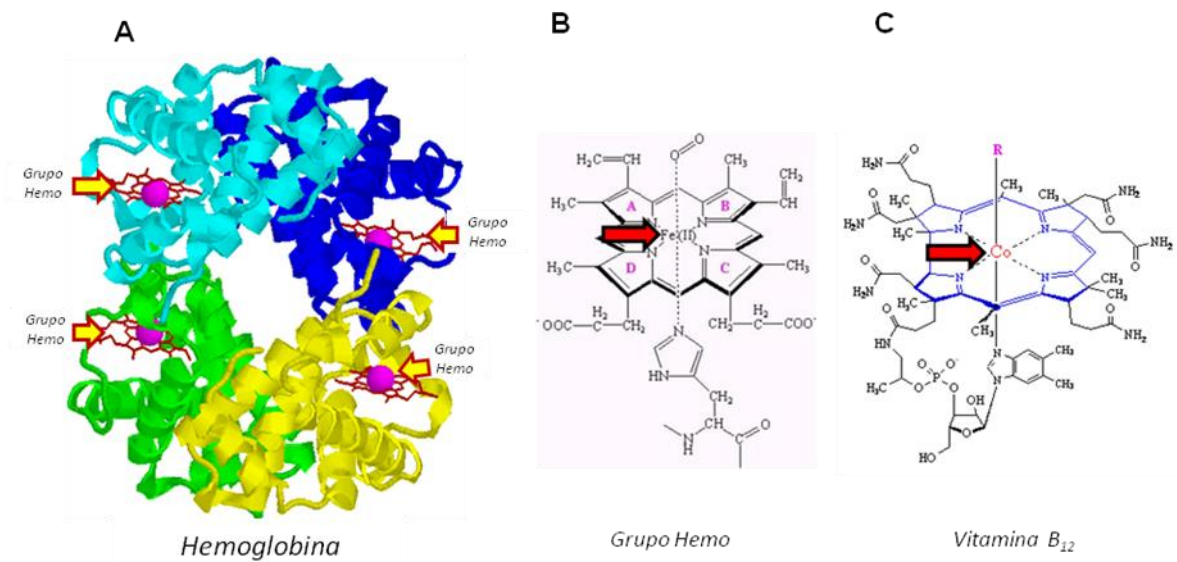


Figura 22. Comparación entre el grupo hemo de la hemoglobina y la Vitamina B₁₂. La Hb está conformada por cuatro subunidades, cada subunidad contiene un grupo hemo, por otro lado tanto el grupo hemo como la Vitamina B₁₂ poseen un anillo tetrapirrólico, la diferencia entre estas estructuras es que el grupo hemo une un átomo de hierro y la Vitamina B₁₂ une un átomo de cobalto, ambos señalados con una flecha.

9. Purificación de proteínas secretadas por *H. pylori* por cromatografía de afinidad.

Otro de nuestros objetivos fue determinar si la bacteria *H. pylori* secreta proteínas con la capacidad de unir el grupo hemo, hasta la fecha no se había demostrado si *H. pylori* es capaz de secretar proteínas con esta capacidad.

10. Las proteínas secretadas y las proteínas celulares (totales) de *H. pylori* no se mezclan.

Con la finalidad de demostrar que el sobrenadante no se contaminó con proteínas celulares (totales) de *H. pylori*, se realizó una inmunodetección para localizar la proteína β -galactosidasa, proteína exclusiva del citoplasma y por lo tanto esta no debería estar presente en las proteínas secretadas. La bacteria *E. coli* se usó como control porque el anticuerpo empleado es contra la proteína β -galactosidasa de esta bacteria y presenta reacción cruzada contra la proteína homóloga en *H. pylori*. En este análisis se obtuvieron proteínas secretadas y totales de *H. pylori* y *E. coli*, que fueron resueltas en geles SDS-PAGE (Figura 23, Panel A), posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó y se incubaron con el anticuerpo anti- β -galactosidasa, la unión entre la proteínas β -galactosidasa y el anticuerpo fue evidenciada por quimioluminiscencia (Figura 23, Panel B). La proteína β -galactosidasa se localizó únicamente en las proteínas totales tanto de *H. pylori* (Figura 23, Panel B, Carril 1) como de *E. coli* (Figura 23, Panel B, Carril 3) y no en las proteínas secretadas de *H. pylori* (Figura 23, Panel B, Carril 2) ni *E. coli* (Figura 23, Panel B, Carril 4). Este resultado muestra que las proteínas totales de ambas bacterias no están contaminando a las proteínas secretadas.

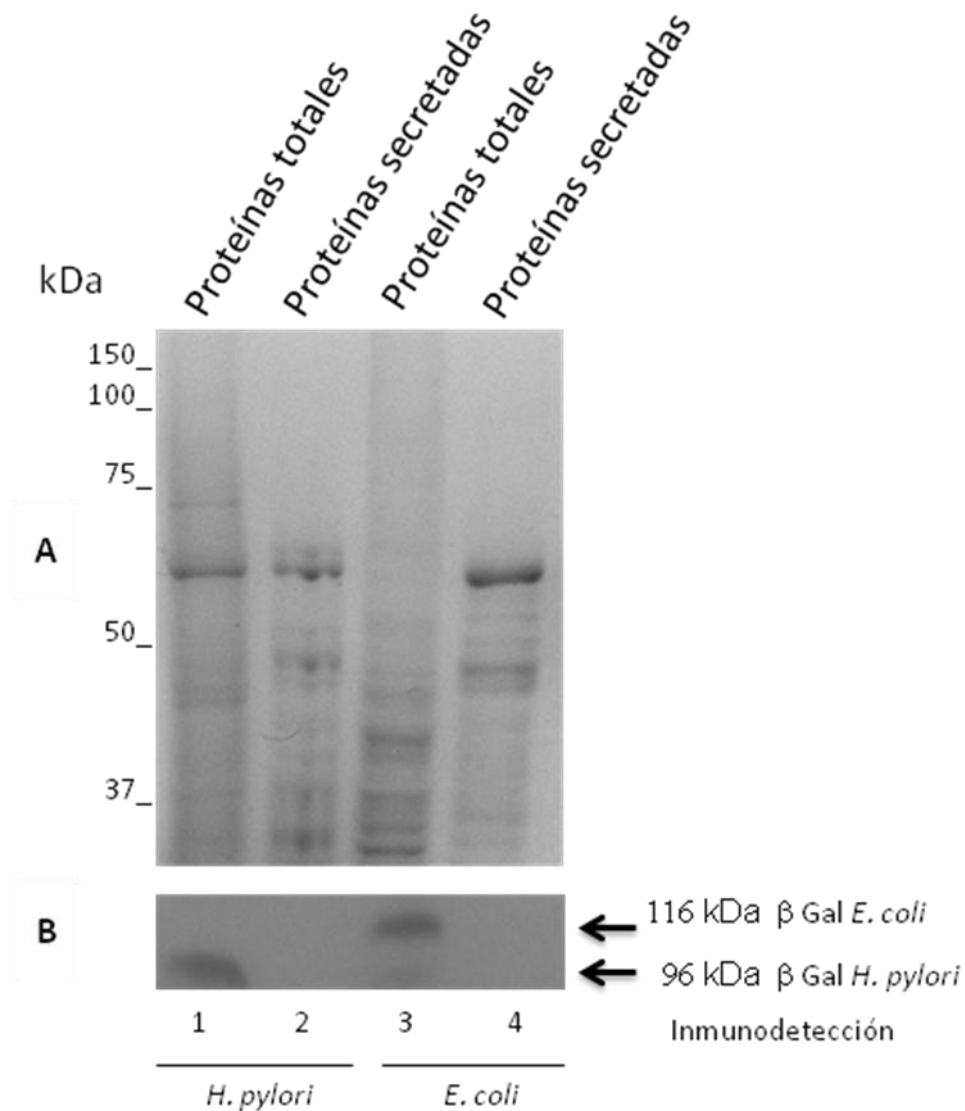


Figura 23. Las proteínas secretadas por *H. pylori* y *E. coli* no se contaminan con sus proteínas totales. Proteínas totales y secretadas de *H. pylori* y *E. coli* en gel SDS-PAGE 12% teñido con plata (A), Inmunodetección (B) donde se señala la banda de la proteína β galactosidasa localizada en la fracción de proteínas totales y no en las proteínas secretadas.

11. Purificación de proteínas secretadas por *H. pylori* por cromatografía de afinidad.

Las proteínas secretadas por *H. pylori* (Figura 24, Carril 1) se pusieron a interactuar con la cromatografía de afinidad, la muestra se centrifugó quedando un sobrenadante el cual contenía a las proteínas que no se unieron a la resina (Figura 24, Carril 2), la resina fue lavada 4 veces con amortiguador de lavado, de esta manera se eliminaron proteínas que se unieron de manera inespecífica (Figura 24, Carriles 3-6), finalmente las proteínas que se unieron al grupo hemo fueron eluidas con una solución 6M de clorhidrato de guanidina (Figura 24, Carril 7). Una de las proteínas eluidas tiene un peso molecular de aproximadamente 58 kDa (Figura 24 recuadro).

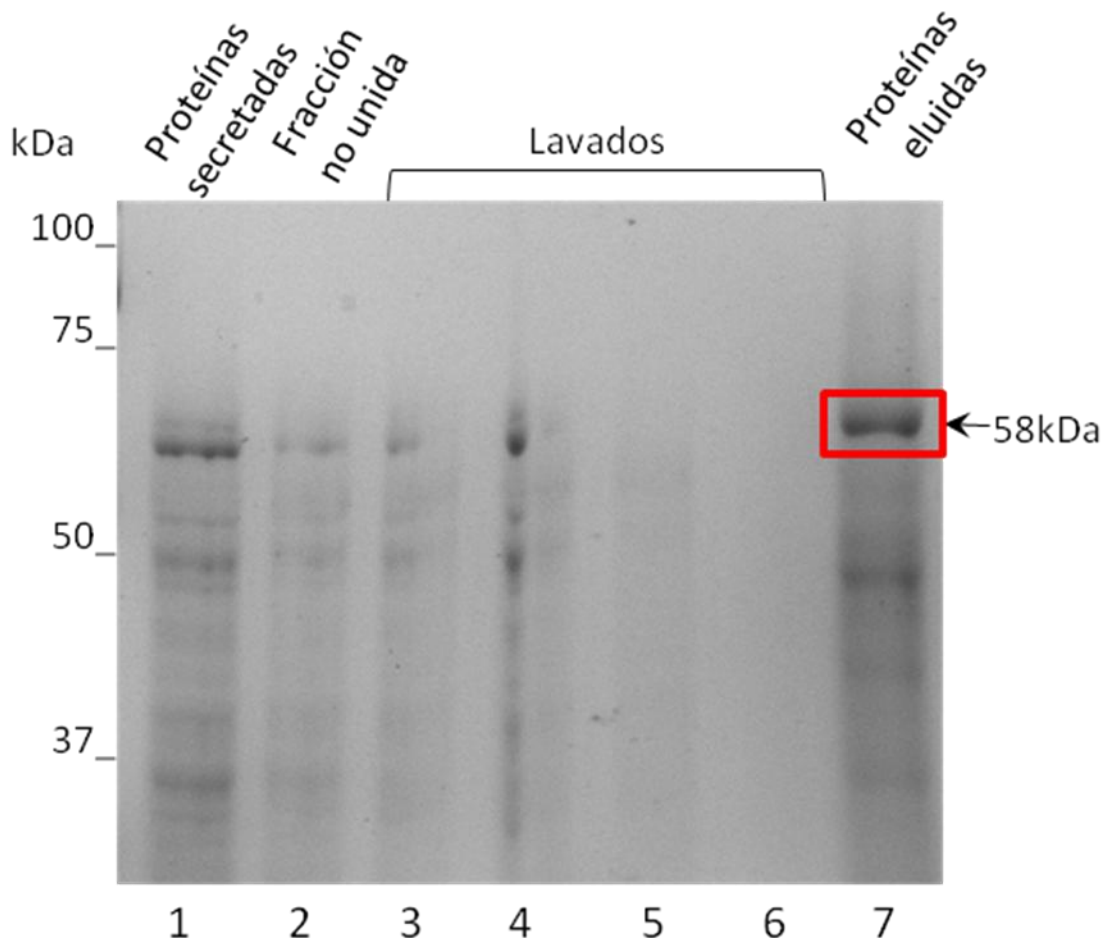
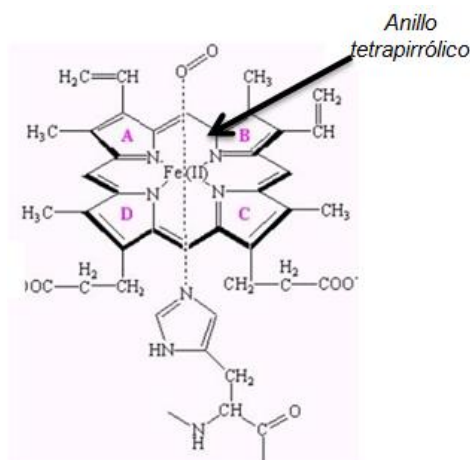


Figura 24. *H. pylori* posee una proteína de 58 kDa afín al grupo hemo. Las proteínas secretadas por *H. pylori* fueron purificadas y cada fracción resuelta, Carril 1 Proteínas secretadas, carril 2 Fracción no unida, carriles 3-6 lavados, carril 7 eluciones. Se señala con una flecha la proteína eluida con un peso aproximado de 58 kDa. a la izquierda se muestra el marcador de peso molecular. SDS-PAGE al 10 % teñido con plata.

12. La proteína secretada de 58 kDa es eluida de la cromatografía de afinidad por compuestos que contienen hierro.

La proteína secretada de 58 kDa de *H. pylori* tiene la capacidad de unir el grupo hemo, el grupo hemo es una estructura constituida por un anillo tetrapirrólico en cuyo centro se localiza un átomo de hierro (Figura 25).



Grupo Hemo

Figura 25. Estructura del grupo hemo. Se señala el anillo tetrapirrólico el cual contiene un átomo de hierro en el centro.

Para determinar si la proteína de 58 kDa se une al anillo tetrapirrólico o al hierro se realizó el siguiente procedimiento: la proteína de 58 kDa se eluyó con compuestos que poseen el anillo tetrapirrólico o con compuestos que contienen hierro. Las proteínas secretadas por *H. pylori* se pusieron a interactuar con la cromatografía de afinidad, se obtuvieron las proteínas que no son afines al grupo hemo, posteriormente la resina se lavó, finalmente las proteínas con afinidad al grupo hemo fueron eluidas con el grupo hemo, FeCl₃6H₂O (hierro), vitamina B₁₂ o Lf, las diferentes eluciones se resolvieron en un gel SDS-PAGE y se observó que el grupo hemo (Figura 26, Panel A, Carril 2), FeCl₃6H₂O (hierro) (Figura 26, Panel A, Carril 3), y la Lf (Figura 26, Panel A, Carril 5) fueron compuestos con la capacidad de desprender la proteína de 58 kDa de la cromatografía de afinidad, mientras tanto la vitamina B₁₂ (Figura 26, Panel A, Carril 4) no fue capaz de separar esta

proteína de la cromatografía de afinidad, por lo tanto se pudo observar que la proteína de 58 kDa es separada de la resina por compuestos que contienen hierro y no por compuestos que tienen solamente el anillo tetrapirrónico, como es el caso de la vitamina B₁₂, además, la vitamina B₁₂ tiene dentro del anillo tetrapirrónico un átomo de cobalto en lugar de un átomo de hierro como es el caso del grupo hemo. Como control de elución se uso clorhidrato de guanidina 6M (Figura 26, Panel A, Carril 1), para determinar que las bandas observadas en el gel no provenían de los eluyentes, estos fueron resueltos en un gel SDS-PAGE, no se observo ninguna proteína (Figura 26, Panel B).

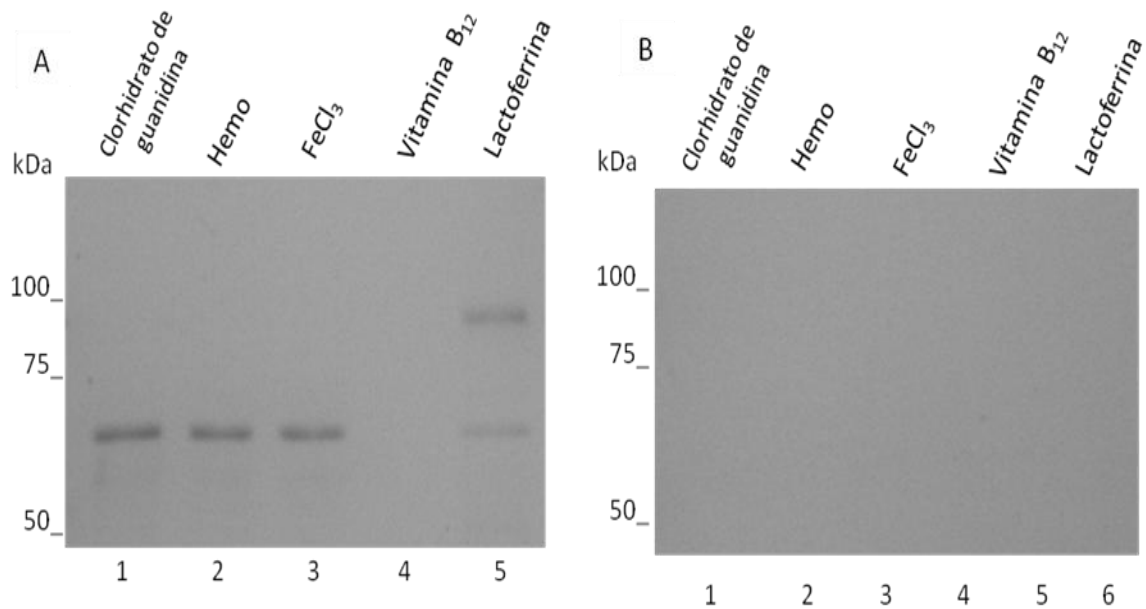


Figura 26. La proteína de 58 kDa es eluida por compuestos que contienen hierro. Las proteínas secretadas por *H. pylori* fueron eluidas con clorhidrato de guanidina 6M (Panel A, Carril 1), hemina (Panel A, Carril 2), FeCl_3 (Panel A, Carril 3), vitamina B_{12} (Panel A, Carril 4) y lactoferrina (Panela A, Carril 5). Los eluyentes fueron resueltos Panel B. SDS-PAGE al 10% teñido con plata.

13. La proteína de 58 kDa es eluida específicamente por hierro y no por otros cationes.

La proteínas de 58 kDa es eluida de la cromatografía de afinidad por compuestos que contienen hierro y por el hierro mismo, para determinar si la proteína de 58 kDa es eluida por otros cationes se procedió a realizar la elución con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (hierro), ZnCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ o CaCl_2 , se observó que la proteína de 58 kDa se eluyó con hierro (Figura 27, Panel A, Carril 2), y no por el ZnCl_2 (Figura 27, Panel A, Carril 3), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (Figura 27, Panel A, Carril 4), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (figura 27, Panel A, Carril 5) o CaCl_2 , (Figura 27, Panel A, Carril 6), el clorhidrato de guanidina 6M fue usado como control de elución (Figura 27, Panel A, Carril 1). Las bandas observadas en el gel no provenían de los eluyentes porque estos fueron resueltos en un gel SDS-PAGE (Figura 27, Panel B) y no se observó ninguna proteína. Por lo tanto se demostró que la proteína de 58 kDa solamente es eluida por el hierro y no por otros cationes, por lo tanto si el hierro es capaz de competir con el grupo hemo de la cromatografía entonces la proteína de 58 kDa se unió de manera preferencial al hierro.

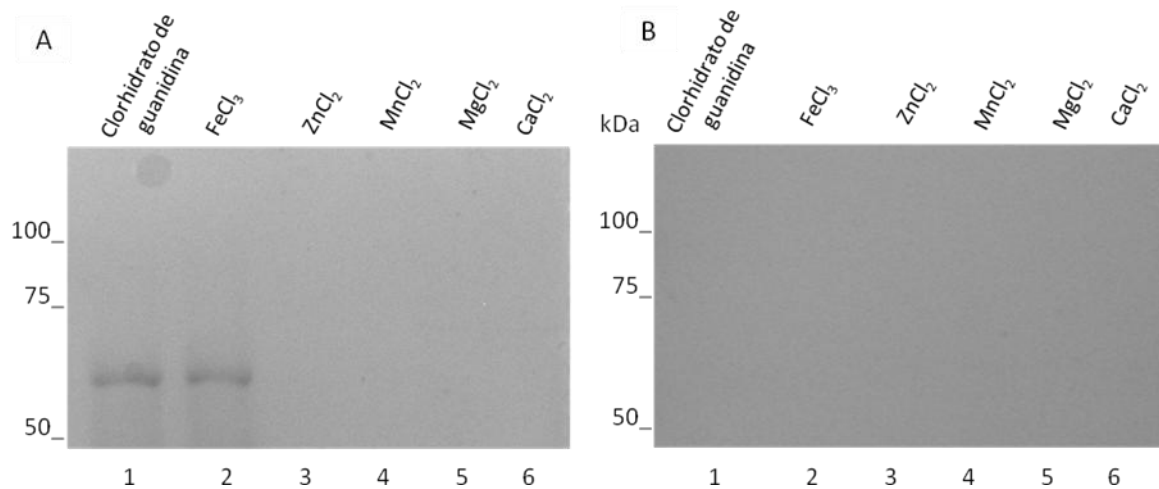


Figura 27. La proteína de 58 kDa es eluida solamente por el hierro. Las proteínas secretadas por *H. pylori* se unieron a la cromatografía de afinidad y fueron eluidas con clorhidrato de guanidina 6M (Panel A, Carril 1), FeCl_3 (Panel A, Carril 2), ZnCl_2 (Panel A, Carril 3), MnCl_2 (Panel a, Carril 4), MgCl_2 (Panel A, Carril 5) y CaCl_2 (Panel A, Carril 6). Los eluyentes se resolvieron Panel B. SDS-PAGE al 10% teñido con plata.

14. La proteína de 58 kDa secretada por *H. pylori* fue identificada como Chaperona GroEL.

La proteína secretada de 58 kDa fue escindida de un gel SDS-PAGE, digerida con tripsina, posteriormente fue inyectada al equipo de espectrometría de masas para su identificación. La información obtenida fue analizada en el programa Mascot y dio como resultado que los péptidos analizados pertenecían a la proteína Chaperona de 60 kDa (CH60-HEPLJ) de *H. pylori* (Figura 28), la cobertura fue del 39%, el peso exacto de la proteína es de 58.26 kDa (tabla 6). La proteína fue nombrada como HpGroEL.

Mascot Search Results

Protein View

Match to: **CH60_HELPJ** Score: 1116
60 kDa chaperonin OS=Helicobacter pylori (strain J99) GN=groL PE=3 SV=1
 Found in search of trejofesec2-120.pk1

Nominal mass (M_r): 58262; Calculated pI value: 5.50
 NCBI BLAST search of [CH60_HELPJ](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Helicobacter pylori J99](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Acetyl (N-term), Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 39%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MAKEIKFSDS ANLLFEGVR QLHDAVKVTM GPRGRNVLIQ KSYGAPSITK
51  DGVSVAKEIE LSCPVANMGA QLVKEVASKT ADAAGDGTTT ETWLEYSIEK
101 EGIRNITAGA NPIEVKRGMD KAAEATINEL KKASKKVGGK EEITQVATIS
151 ANSDHNIGKL IADAMEKYGK DGVITVEEAK GIEDEL DVVE GMQFDRGYLS
201 PYFVTNAEKM TAQLDNAYIL LTDKKISSMK DILPLLEKTM KEGKPLLIIA
251 EDIEGEALTT LVVNKLRGVL NIAAVKAPGF GDRRKEMLID IAILTGGQVI
301 SEELGLSLEN AEVEFLGKAG RVIDKDNTT IVDGKGHSID VKDRVAQIKT
351 QIASTTSDYD KEKLOERLAK LSGGVAVIKV GAASEVENKE KKDRVDDALS
401 ATKAAVEEGI VIGGGAALIR AAQIVHLNLH ODEKVGYEII MRATKAPLAQ
451 IAINAGYDGG VVVNEVQKHE GHFGFNASNG KYVDMFKEGI IDPLKVERIA
501 LQNAVSVSSL LLTTEATVHE IKEEKAAPAM PDMGGMGGMG GMGGMM
  
```

Figura 28. La proteína de 58 kDa fue identificada como GroEL (HpGroEL). Los datos recabados por espectrometría de masas fueron analizados con el programa Mascot, se muestran en un recuadro los péptidos identificados.

Tabla 7. Características de la proteína GroEL de *H. pylori* identificada por espectrometría de masas.

Número de acceso Prot	de Swiss Proteína	Cobertura	Masa (kDa/pI)	Mascot score	Péptidos únicos	Función
Q9ZN50	60 kDa chaperona (GroEL)	39%	58.26/5.5	1116	24	Previene el desplegamiento y promueve el plegamiento de proteínas bajo estrés

15. HpGroEL tiene una mayor cantidad de Histidinas y Tirosinas que otras proteínas GroEL.

Se tiene el concepto general de que la proteína GroEL es una chaperona que junto a la proteína GroES ayuda en el plegamiento y evita el desplegamiento de las proteínas (Sigler y cols, 1998), por lo tanto resultó interesante ver que la proteína HpGroEL de *H. pylori* tiene la capacidad de unir hierro. Se tiene evidencia de que algunas proteínas como el hemóforo de *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) pueden unir el hierro que se encuentra en el grupo hemo, por medio de los residuos de aminoácidos Histidina (H) y Tirosina (Y) (Figura 29).

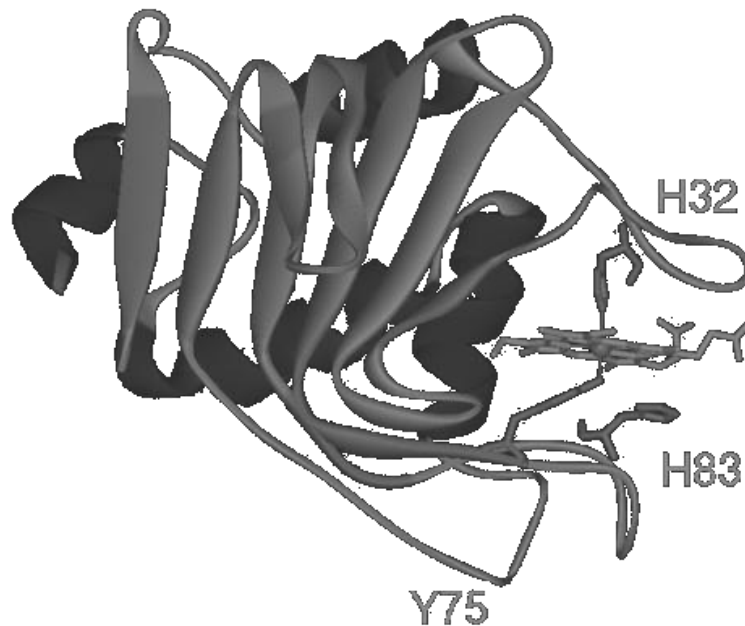


Figura 29. Hemóforo HasA de *S. marcescens*. Se muestran los residuos de H32, Y75 e H83 uniéndose al hierro del grupo hemo.

Basados en esta característica del hemóforo de *S. marcescens* nos dimos a la tarea de buscar los residuos de H y Y en la proteína HpGroEL y en proteínas GroEL de bacterias relacionadas, para esto se buscaron las secuencias de aminoácidos de las proteínas GroEL de las bacterias: *Helicobacter pylori* 26695, *Helicobacter pylori* HPGA1, *Helicobacter felis*, *Helicobacter mustelae*, *Helicobacter*

hepaticus, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus anthracis*, *Bacillus avium*, *Clostridium botulinum*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis*, se alinearon en el servidor ClustalW y los aminoácidos H y Y se resaltaron con el programa JalView, con el programa ClustalW se determinó que las secuencias de proteínas GroEL son homologas y que poseen un 60% de similitud, además se pudo apreciar que la proteína HpGroEL de *H. pylori* J99 posee una mayor cantidad de H y Y que las otras bacteria que se usaron para el alineamiento (Figura 30), por ejemplo se comparó HpGroEL con la secuencia GroEL de *E. coli*, que se uso como control, se observó que la proteína HpGroEL posee 7 H y 2 Y más que la secuencia GroEL de *E. coli*, esta diferencia posiblemente sea la razón de porque la proteína HpGroEL tiene la capacidad de unir hierro.

	430	440	450	460	470	480
<i>Hpyloni-J99</i>	AAQKVHLNLHDDEK - - VG	YEIIMRAIKAPLAQIAINAG	YDGGVVVNEVQKH - EG	HFGFN		
<i>Hpyloni-HPAG1</i>	AAQKVHLNLHDDEK - - VG	YEIIMRAIKAPLAQIAINAG	YDGGVVVNEVEKH - EG	HFGFN		
<i>Hpyloni-26695</i>	AAQKVHLNLHDDEK - - VG	YEIIMRAIKAPLAQIAINAG	YDGGVVVNEVEKH - EG	HFGFN		
<i>H-felis</i>	AAQKVHLNLHEDEK - - VG	YEIIMRAIKAPLAQIAANAG	YDRGVVVNEVEKH - KEA	HYGFN		
<i>H-mustelae</i>	AAQKVNLHLHGDEA - - VG	YDIIMRAIKAPLAQIAANAG	FDSGVVVNEVENK - KDA	FGFN		
<i>H-hepaticus</i>	ASQKVKLKLEGDEA - - IG	YDIIMRAIKAPLAQIATNAG	YDAGVVVNEVEKNSKDG	FGFN		
<i>E-coli</i>	VASKLAD - LRGNEDQNVGIKVALRAMEAPLRQ	IVLNCGEEPSVVANTVKGG - DGN	YGFN			
<i>S-dysenteriae</i>	VASKLAD - LRGNEDQNVGIKVALRAMEAPLRQ	IVLNCGEEPSVVANTVKGG - DGN	YGFN			
<i>S-typhi</i>	VASKIAD - LKGNEDQNVGIKVALRAMEAPLRQ	IVLNCGEEPSVVANTVKGG - DGN	YGFN			
<i>K-pneumoniae</i>	VAAKLAG - LTGNEDQNVGIKVALRAMEAPLRQ	IVSNAGEEPSVVANNVKAG - DGN	YGFN			
<i>Y-pestis</i>	AAHAIAG - LKGDNEEQNVGIKVALRAMESPLRQ	IVVNAGEEASVIANKVKAG - EGS	FGFN			
<i>H-influenzae</i>	AAAKVAASLKGDNEEQNVGIKLALRAMEAPLRQ	IVTNAGEEASVVASAVKNG - EGN	FGFN			
<i>V-cholerae</i>	AASKLSS - LVGDNEEQNVGIRVALRAMEAPLRQ	IVKNAGDEESVVANNVRAG - EGN	YGFN			
<i>Paeruginosa</i>	ALQAI EG - LKGDNEEQNVGIALLRRAVESPLRQ	IVANAGDEPSVVVDKVKQG - SGN	YGFN			
<i>B-auium</i>	AKQAIAG - LQGDTPDQNAGIKLILRAVEEPLRT	IVTNAGEEASVVVNNVLNG - KGN	YGFN			
<i>N-meningitidis</i>	ARAAL EN - LHTGNADQDAGVQIVLRAVESPLRQ	IVANAGGEPSSVVVNKVL EG - KGN	YGFN			
<i>B-anthraxis</i>	VYTKVAS - IVAEG - DEATGINIVLRAL EEPVRQ	IAINAGLEGSVVVERLKGE - KVG	VGFN			
<i>S-pneumoniae</i>	VIPAVAT - LELTG - DEATGRNIVLRAL EEPVRQ	IAHINAGFEGSIVIDRLKNA - ELG	IGFN			
<i>C-botulinum</i>	IIPKIAD - LTSDIIDVKLGIDIIKRAL EEPVRQ	IANNAGAEGSVIIEKVKAT - EAG	VGYD			

Figura 30. Alineamiento de aminoácidos de diferentes proteínas GroEL. Se incluyen secuencias de la cepa *Helicobacter* y de cepas relacionadas, se enfatizan los residuos Histidina (H) y Tirosina (Y). El alineamiento se realizó en el servidor ClustalW y se editó con el programa JalView versión 2.8.

16. La proteína GroEL de *E. coli* no une el grupo hemo.

HpGroEL puede unir hierro y al grupo hemo, además cuenta con una mayor cantidad de aminoácidos H y Y que posiblemente le proporcionen esta capacidad, la proteína GroEL de *E. coli* tiene una menor cantidad de H y Y por lo que tal vez no pueda unir el grupo hemo ni hierro. Para investigar esta idea se decidió obtener las proteínas totales de *E. coli* (Figura 31, Panel A, Carril 1) y proteínas citoplásmicas (Figura 31, Panel C, Carril 1) de *H. pylori*, purificarlas a través de la cromatografía de afinidad. Con la resina se realizó el procedimiento de purificación, se obtuvieron las proteínas que no se unen a la cromatografía de afinidad tanto de *E. coli* (Figura 31, Panel A, carril 2) como de *H. pylori* (Figura 31, Panel C, carril 2), la resina se lavó 4 veces para eliminar proteínas que se unieron de manera inespecífica, *E. coli* (Figura 31, Panel A, Carriles 3-6), *H. pylori* (Figura 31, Panel C, Carriles 3-6), finalmente las proteínas se eluyeron de la resina con una solución de clorhidrato de guanidina 6M, *E. coli* (Figura 31, Panel A, Carril 7) y *H. pylori* (Figura 31, Panel C, carril 7). Posteriormente para evidenciar la presencia de la proteína GroEL se realizó una inmunodetección, las proteínas de cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, bloqueadas e incubadas con el anticuerpo anti-GroEL que fue evidenciado con un anticuerpo acoplado a HRP, la unión del anticuerpo con la proteína se evidenció por quimioluminiscencia. La inmunodetección nos demostró que la proteína GroEL está presente en las proteínas totales de *E. coli* (Figura 31, Panel B, Carril 1), en la fracción de proteínas que no se unen a la resina (Figura 31, Panel B, Carril 2), no se observó durante los lavados (Figura 31, Panel B, Carriles 3-6) y finalmente no se obtuvo en la elución (Figura 31, Panel B, Carril 7), estos datos nos mostraron que la bacteria *E. coli* posee la proteína chaperona GroEL (EcGroEL) pero que no tiene la capacidad de unir el grupo hemo y por lo tanto tampoco podría unir hierro. Por otro lado, este procedimiento se aplicó a las proteínas citoplásmicas de *H. pylori* y se evidenció su presencia en las proteínas citoplásmicas (Figura 31, Panel D, Carril 1), en las proteínas que no se unen a la resina (Figura 31, panel D, Carril 2), no se

observó durante los lavados (Figura 31, Panel D, Carriles 3-6) pero si en la elución (Figura 31, Panel D, Carril 7), esto nos sugirió que tanto la proteína HpGroEL secretada como la HpGroEL citoplásmica tiene la capacidad de unirse al grupo hemo y por lo tanto se trate de la misma proteína.

Finalmente se realizó el modelaje 3D de las proteínas HpGroEL y EcGroEL con la finalidad de ver su estructura en el espacio, observar si ambas proteínas son estructuralmente similares y localizar los aminoácidos H y Y. En el servidor UniProt se obtuvo la secuencia de los aminoácidos de la proteína HpGroEL (Q9ZN50) y EcGroEL (P0A6F7), posteriormente se cargó en el servidor CPHmodels para obtener el respectivo archivo PDB el cual fue visualizado en el programa PyMol v0.9 (Figura 32), HpGroEL (Figura 32, Panel A) y EcGroEL (figura 32, Panel B) son homologas y tienen una similitud del 60%, por lo tanto su estructura en el espacio es semejante pero cabe destacar que el contenido de los aminoácidos H y Y son diferentes, HpGroEL contiene 7H y 2Y mas que EcGroEL, en el modelaje los residuos de H y Y se muestran en negro y tal vez su disposición en el espacio es lo que le permite a la proteína HpGroEL la capacidad de unir hierro.

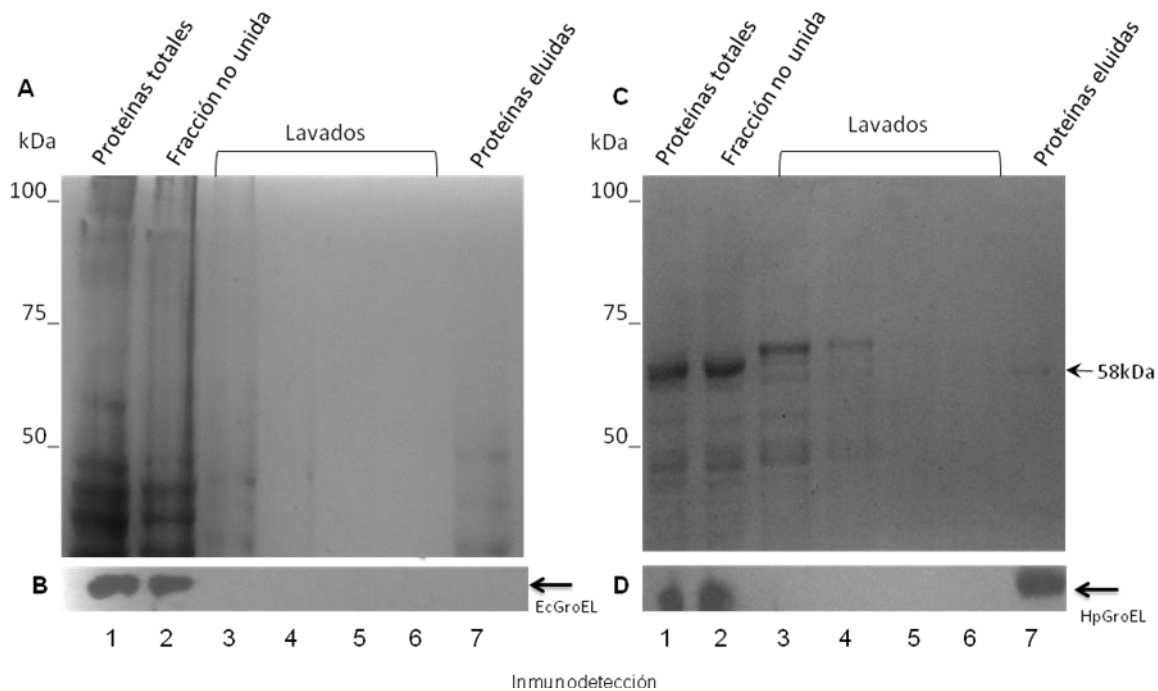


Figura 31. La proteína chaperona GroEL de *E. coli* (EcGroEL) no une el grupo hemo. Tanto en proteínas totales de *E. coli* (A), como en citoplásmicas de *H. pylori* (C), se inmunolocalizó la proteína GroEL con el anticuerpo anti-GroEL (B y D). Puede apreciarse que la proteína GroEL de *E. coli* no es purificada a través de la cromatografía de afinidad como sucede en el caso de la proteína GroEL de *H. pylori*. Proteínas totales (Carril 1), Fracción no unida (Carril 2), Lavados (Carriles 3-6), Proteínas eluidas (Carril 7). SDS-PAGE al 10% teñido con plata.

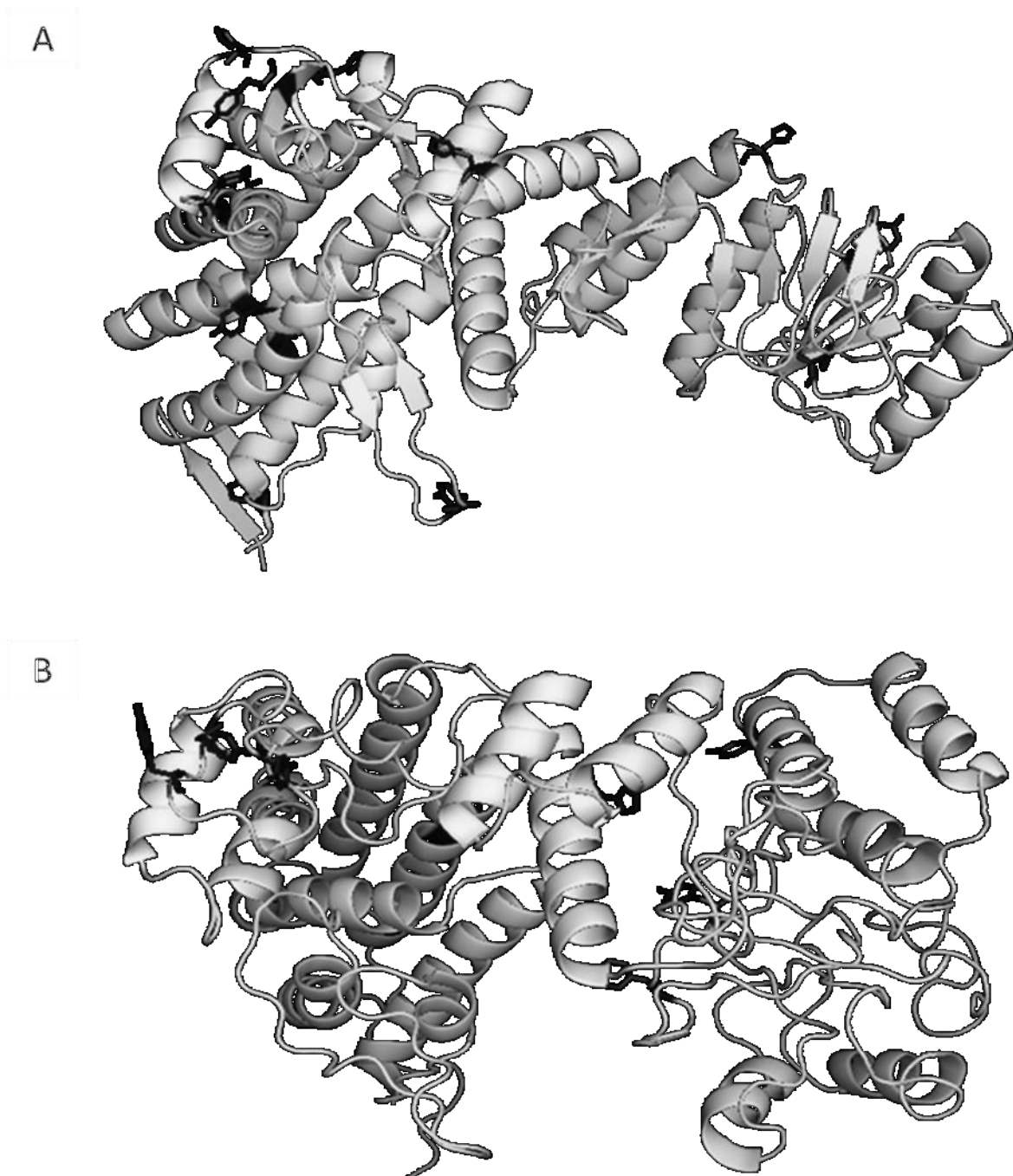


Figura 32. Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas HpGroEL y EcGroEL. La estructura de HpGroEL (A) y EcGroEL (B) son semejantes, las proteínas se muestra en gris, se marcan en negro los residuos de H y Y. Los archivos PDB fueron obtenidos y se cargaron en el programa PyMol 0.9.

VI. DISCUSIÓN

En la presente tesis damos a conocer que la bacteria *H. pylori* cuenta con por lo menos 8 proteínas de membrana que une hemo y que una de ellas es FrpB3 que pertenece a la familia de proteínas de membrana reguladas por hierro, por otro damos a conocer por primera vez que esta bacteria secreta una proteína chaperona GroEL que tiene la capacidad de unir hierro.

H. pylori es una bacteria que se ha adaptado al medio ambiente que se encuentra en el estómago, es capaz de sobrevivir generando un ambiente alcalino y obtener los nutrientes necesarios para su sobrevivencia. Durante su proceso invasivo esta bacteria requiere de nutrientes y elementos que le ayudan a llevar a cabo sus funciones vitales, dentro de estos elementos se encuentra el hierro, elemento que por sus características químicas se encuentra a una concentración insuficiente para que la bacteria pueda sobrevivir, por ello *H. pylori* ha desarrollado una serie de mecanismos que le permiten obtener hierro de metaloproteínas como la Hb, el grupo hemo y Lf que son proteínas contenedoras de este elemento.

A través de nuestra investigación hemos dado evidencia de que la bacteria *H. pylori* cuenta con más de una proteína de membrana que es capaz de unir Hb, que se suma a los datos anteriormente proporcionados por Worst en 1995, por ello es que decidimos purificar proteínas empleando la cromatografía de afinidad cuyo ligando es el grupo hemo, con esta técnica no solo hemos sido capaces de purificar e identificar proteínas que se unen al grupo hemo y a la hemoglobina sino también aquellas que pueden unir hierro, por lo que con esta metodología, de alguna manera, abarcamos la mayoría de las proteínas que unen o almacenan hierro y que pueden ser posibles fuentes de hierro para *H. pylori*.

En esta investigación se hizo crecer a *H. pylori* en un medio suplementado con sangre de carnero donde se le proporcionaron los nutrientes suficientes para sobrevivir, por lo que las proteínas de membrana purificadas, posiblemente, son

las que la bacteria sintetizaría de manera común para obtener hierro a partir de Hb, por otro lado, para conocer las proteínas secretadas por *H. pylori* que se relacionan con la obtención de hierro, se creció a esta bacteria en un medio suplementado con este elemento con la finalidad de estimular la síntesis de proteínas secretadas que estuvieran relacionadas con la unión de hierro.

Con respecto a las proteínas de membrana hemos purificado e identificado varias proteínas (Tabla 6) pero una resultó ser muy interesante, en trabajos previos habíamos realizado un análisis *in silico* para encontrar proteínas de membrana que unen Hb, usamos la proteína ChuA de *E. coli* como referencia y fue lanzada contra el proteoma de *H. pylori*, el servidor (Expasy Blast) dio como resultado tres proteínas llamadas FrpB1, FrpB2 y FrpB3, de las cuales ya hemos caracterizado FrpB1 (Carrizo-Chávez y cols, 2012) y FrpB2 (González y Olivares, 2009), la tercera estaba en proceso de ser caracterizada pero con la metodología empleada fuimos capaces de purificarla e identificarla. Las proteínas FrpB1, FrpB2 y FrpB3 fueron clasificadas, mediante un análisis *in silico*, como Proteínas de Membrana Externa Reguladas por Hierro tipo FrpB (Alm y cols, 2000). Sin embargo, hasta la fecha no se había caracterizado o demostrado que alguna de estas proteínas tuvieran la capacidad de unir y obtener hierro a partir de la Hb y el grupo hemo, por lo que, con la investigación realizada estamos identificando las probables proteínas que conforman el mecanismo de adquisición de hierro en *H. pylori*. Una de estas proteínas es FrpB3. FrpB3 fue purificada a través de una cromatografía de afinidad cuyo ligando es el grupo hemo, por los ensayos realizados no es capaz de unir Hb, resulta interesante observar las características de estas proteínas por un lado FrpB1 tiene la capacidad de unir tanto al grupo hemo como Hb, FrpB2 solo une Hb y por los datos obtenidos FrpB3 solo une el grupo hemo, esto nos habla de la enorme variedad de proteínas con las que cuenta *H. pylori* para poder obtener hierro de cualquier fuente que tenga en frente, esto nos muestra la capacidad de adaptación de esta bacteria a su medio ambiente. Ahora bien, bajo las condiciones de crecimiento de *H. pylori* podemos pensar que la proteína FrpB3 se expresa de manera constitutiva.

Por otro lado hemos encontrado una proteína que es sintetizada por esta bacteria y tiene la capacidad de unir hierro, resultado interesante encontrar que se trata de la chaperona GroEL, porque el papel que desempeña esta proteína es mantener el plegamiento de otras proteínas, además es considerada como una proteína propia del espacio citoplasmático, por lo que es de gran interés haber encontrado dos características no únicas pero si raras de esta proteína: 1) Localizarla sin necesidad de lisis celular como proteína secretada y 2) tener la capacidad de unir hierro, creemos que estas funciones podrían estar asociadas a que la bacteria vive en un medio hostil como lo es el estómago por ello necesita transportar proteínas protegidas por las chaperonas para que puedan llegar en su estado funcional, a su sitio de acción y posiblemente, acarrear hierro, que bajo las condiciones del estomago es limitado, considerando que este elemento es esencial para el funcionamiento de algunas proteínas. De ahí que esta bacteria posiblemente haya adecuado a su proteína GroEL para tener esta doble función y con ello economizar recursos que posiblemente son escasos en su hábitat.

En el caso de las proteínas de membrana pudimos comprobar que un compuesto parecido al grupo hemo, que en este caso fue la vitamina B₁₂, fue capaz de unirse a las proteínas purificadas, esto probablemente porque ambos compuestos tienen en común el anillo tetrapirrólico, solo que el grupo hemo une hierro y la vitamina B₁₂ une cobalto, esto abre una posibilidad en cuanto un posible tratamiento que se basaría en el uso de la Vitamina B₁₂ para bloquear los receptores que tienen afinidad por la hemoglobina, esta técnica terapéutica se vería reforzada en los casos en que *H. pylori* causa anemia ferropénica porque una terapia es la administración de Vitamina B₁₂ y con este procedimiento estaríamos ayudando al paciente para que se recupere de la anemia y a su vez recuperarse de la infección por *H. pylori* porque estaríamos limitando su acceso al hierro que es básico para la colonización, infección y desarrollo de la bacteria.

VII. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo hemos dado evidencia de que esta bacteria cuenta con una gran cantidad de proteínas que le ayudan a obtener uno de los elementos esenciales para sobrevivir, esto es, el hierro.

Hemos identificado varias proteínas de membrana entre ellas a FrpB3 con la cual abarcamos toda una familia especializada en la obtención de hierro.

Por primera vez hemos identificado una proteína secretada por *H. pylori* que tiene la capacidad de unir hierro, se trata de la proteína GroEL, consideramos que esta capacidad la ha adquirido a través del tiempo y por ello ahora puede obtener y acarrear este elemento además de mantener el correcto plegamiento de las proteínas secretadas como es el caso de la proteína ureasa, esto nos lleva a pensar que la proteína GroEL tiene una doble función, característica que ya ha sido reportada para otras proteínas y se les conoce como proteínas moon lighting.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P, Hancock RE, Trust TJ. 2000. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun.* Jul;68(7):4155-68.
2. Andresen HM, Regueira NT y Leighton F. 2006. Estrés oxidativo en el paciente critico. *Rev Med Chile.* 134:649-659
3. Andrews NC, Bridge KR. 1998. Disorders of iron metabolism and sideroblastic anemia. En: *Nathan and Oski's Hematology of infancy and childhood.* 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 423-61.
4. Andrews Simon C, Robinsón Andrea K., Rodríguez-Quiñónez Francisco. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* 27:215-237.
5. Anonymous. 1985. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB: list no. 17. *Int. J. Syst. Bacteriol.*; 35:223–225.
6. Aspinall G O, Monteiro M A, Pang H, Walsh EJ, Moran AP. 1996. Lipopolysaccharide of the *Helicobacter pylori* type strain NCTC 11637 (ATCC 43504): structure of the O antigen chain and core oligosaccharide regions. *Biochemistry.* 35: 2489-97.
7. Azuma T, Konishi J, Tanaka Y, Hirai M, Ito S, Kato T. 1994. Contribution of HLA-DQA gene to host response against *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 343: 542-543.
8. Baker HM, Anderson BF, Baker EN. 2003. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3579-83.
9. Bauerfeind P, Garner R, Dunn B E, Mobley H L T. 1997. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut.* 40: 25-30
10. Belzer C, Stoof J, van-Vliet A. 2007. Metal responsive gene regulation and metal transport in *Helicobacter* species. *Biometals.* 20: 417-29.
11. Bereswill Ernst FD, S, Waidner B, Stoof J, Mader U, Kusters JG, Kuipers EJ, Kist M, van Vliet AH, Homuth G. 2005. Transcriptional profiling of

- Helicobacter pylori* Fur- and iron-regulated gene expression. *Microbiology*. 151:533-46.
12. Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE. 2006. *H. pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 35:5599-605.
 13. Bracken CS, Baer MT, Abdur-Rashid A, Helms W, Stojiljkovic I. 1999. Use of heme-protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *J Bacteriol*. 181:6063-72.
 14. Burkhard Kimberly A. y Wilks Angela. 2007. Characterization of the Outer Membrane Receptor ShuA from the Heme Uptake System of *Shigella dysenteriae*. *J. Biol Chem*. 282:15126-15136.
 15. Butler A. Iron acquisition: straight up and on the rocks?. 2003. *Nat Struct Biol*. Apr;10(4):240-1.
 16. Carrizo-Chávez M. A., Cruz-Castañeda A., Olivares-Trejo J de J. 2012. The frpB1 gene of *Helicobacter pylori* is regulated by iron and encodes a membrane protein capable of binding haem and haemoglobin. *FEBS Lett*. 586, 875-9.
 17. Chandra R K, Saraya A K. 1975. Impaired immunocompetence associated with iron deficiency. *J Ped*. 86:899-902
 18. Chen M, Lee A, Hazell S. 1995. Immunization against gastric *helicobacter* infection in a mouse/*Helicobacter felis* model. *Lancet*. 339:1120–1121.
 19. Chu GC, Tomita T, Sönnichsen FD, Yoshida T, Ikeda-Saito M. 1999. The heme complex of Hmu O, a bacterial heme degradation enzyme from *Corynebacterium diphtheriae*. Structure of the catalytic site. *J Biol Chem*. 27:24490-6.
 20. Cover, T. L., and M. J. Blaser. 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem*. 267:10570–10575.
 21. DeCarlo AA, Paramaesvaran M, Yun PL, Collyer C, Hunter N. 1999. Porphyrin-mediated binding to hemoglobin by the HA2 domain of cysteine proteinases (gingipains) and hemagglutinins from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*. Jun;181(12):3784-91

22. Dhaenens L, Szczebara F, Husson MO. 1997. Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 65:514-8.
23. Doenges J. L. 1939. Spirochetes in the gastric glands of macacus rhesus and of man without related diseases. *Arch. Pathol*. 27:469–477.
24. DuBois S, Kearney DJ. 2005. Iron-deficiency anemia and *Helicobacter pylori* infection: a review of the evidence. *Am J Gastroenterol*. 2005. 100: 453-459
25. Elkins C. 1995. Identification and purification of a conserved heme-regulated hemoglobin-binding outer membrane protein from *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun*. 63:1241-5.
26. Elkins Christopher, Chen Ching-ju, and Thomas Christopher E. 1995. Characterization of the *hgbA* Locus Encoding a Hemoglobin Receptor from *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun*. 63:2194-2200.
27. El-Omar E. M, Carrington M, Chow W. H, McColl K. E, Bream J. H, Young H. A, Herrera J, Lissowska J, Yuan C. C, Rothman N, Lanyon G, M. Martin, J. F. Fraumeni, Jr, and C. S. Rabkin. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer”. *Nature*. 404:398–402.
28. Fatht Michael j. and Kolter Roberto. 1993. ABC Transporters: Bacterial Exporters. *Microbiol Rev*. 57:995-1017.
29. Figura N, Orderda G. 1996. Reflections on the first description of the presence of *Helicobacter* species in the stomach of mammals”. *Helicobacter*. 1:4–5.
30. Forrellat BM, Gauttier du Défaix GH y Fernández DF. 2000. Metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 16 :149-60.
31. Freedberg A. S., Baron L. E. “The presence of spirochetes in human gastric mucosa”. *Am. J. Dig. Dis*. 1940. 7:443–445.
32. Fujimura S, Shibata Y, Hirai K, Nakamura T. 1996. Binding of hemoglobin to the envelope of *Porphyromonas gingivalis* and isolation of the hemoglobin-binding protein. *Infect Immun*. 64:2339-42.
33. Genco CA, Dixon DW. 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol*. 39:1-11.

34. Gerhard M, N. Lehn, N. Neumayer, T. Boren, R. Rad, W. Schepp, S. Miehke, M. Classen, and C. Prinz. 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:12778–12783.
35. González-López M.A., Olivares-Trejo J. J. 2009. The gene frpB2 of *Helicobacter pylori* encodes an hemoglobin-binding protein involved in iron acquisition. *Biometals*. 22, 889-94.
36. Goodwin C. S., Armstrong J. A., Chilvers T., Peters M., Collins M. D., Sly L., McConnel W., Harper W. E. S. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *H. pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively". *Int. J. Syst. Bacteriol*. 39:397–405.
37. Goodwin C. S., McCulloch R. K., Armstrong J. A., Wee S. H. 1985. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J. Med. Microbiol*. 19:257–267.
38. Graham D Y, Adam E, Reddy GT, Agarwal J P, Evans D J Jr, Malaty HM. 1991. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries. *Dig Dis Sci* 1991. 36: 1084-1088.
39. Granstrom M, Tindberg Y, and M. Blennow. 1997. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *J. Clin. Microbiol*. 35:468–470.
40. Guan SM, Nagata H, Maeda K, Kuboniwa M, Minamino N, and Shizukuishi S. 2004. Purification and characterization of a hemoglobin-binding outer membrane protein of *Prevotella intermedia*. *FEMS*. 235:333-339.
41. Haeckel R. 1996. *Helicobacter pylori* infection. Part 1: Epidemiology, pathobiochemistry, diagnosis and therapy". *Lab Med*. 20: 78-84.
42. Holcombe C, Omotara B A, Eldridge J, Jones D M. 1992. *Helicobacter pylori*, the most common bacterial infection in Africa: A random serological study". *Am J Gastroenterol*. 87: 28-30.

43. Horton R H, Moran L A, Ochs R S, Rawn J D and Scrimgeour K G. Principles of biochemistry. 2002. Prentice Hall.
44. Husson MO, Legrand D, Spik G, Leclerc H. 1993. Iron acquisition by *Helicobacter pylori*: importance of human lactoferrin. *Infect Immun.* 61:2694-7.
45. Illingworth DS, Walter KS, Griffiths PL, Barclay R. 1993. Siderophore production and iron-regulated envelope proteins of *Helicobacter pylori*. *Zentralbl Bakteri.* 280:113-9
46. Klein P D, Gilman R H, León-Barúa R, Díaz F, Smith E O, Graham D Y. 1994. The epidemiology of *Helicobacter pylori* in Peruvian children between 6 and 30 months of age. *Am J Gastroenterol.* 89(12):2196-2200.
47. Kuipers E. J, A. M. Uytendaele, A. S. Pena, H. J. Hazenberg, E. Bloemena, J. Lindeman, E. C. Klinkenberg-Knol, and S. G. Meuwissen. 1995. Increase of *Helicobacter pylori*-associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: implications for long-term safety. *Am. J. Gastroenterol.* 90:1401–1406.
48. Kusters J G, van Vliet A H, Kuipers E J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection". *Clin Microbiol Rev.* 19(3):449-90.
49. Lazaraki G, Kountouras J, Metallidis S, Vrettou E, Tzioufa V, Germanidis G, Chatzopoulos D, Zavos C, Giannoulis K, Nikolaidis P. 2008. *Helicobacter pylori* infection upregulates endothelial nitric oxide synthase expression and induces angiogenesis in gastric mucosa of dyspeptic patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 20:441-9.
50. Lewis L. A., Gipson M., Hartman K., Ownbey T., Vaughn J. and Dyer D. W. Phase variation of HpuAB and HmbR, two distinct haemoglobin receptors of *Neisseria meningitidis* DNM2. *Mol Microbiol.* 32:977-989
51. Liu X, Olczak T, Guo HC, Dixon DW, Genco CA. 2006. Identification of amino acid residues involved in heme binding and hemoprotein utilization in the *Porphyromonas gingivalis* heme receptor HmuR. *Infect Immun.* 74:1222-32.
52. Maeda S, H. Yoshida, T. Ikenoue, K. Ogura, F. Kanai, N. Kato, Y. Shiratori,

- and M. Omata. 1999. Structure of cag pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut*. 44:336–341.
53. Mahdavi J, B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarstrom, and T. Boren. 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation". *Science*. 297:573–578.
 54. Mahdavi J, T. Boren, C. Vandenbroucke-Grauls, and B. J. Appelmelk. 2003. Limited role of lipopolysaccharide Lewis antigens in adherence of *Helicobacter pylori* to the human gastric epithelium. *Infect. Immun*. 71: 2876–2880.
 55. Majmudar P, Shah SM, Dhunjibhoy KR, Desai HG. 1990. Isolation of *H. pylori* from dental plaques in health volunteers". *Indian J Gastroenterol*. 9:271-2
 56. Malyszko J, Mysliwiec M. 2007. Hecpidin in Anemia and Inflammation in Chronic Kidney Disease". *Kidney Blood Press Res*. 30: 15-30.
 57. Marshall B. 2002. Gastric spirochaetes: 100 years of discovery before and after Kobayashi. *Keio J Med*. Dec;51 Suppl 2:33-7.
 58. Marshall B. J, Goodwin C. S. 1987. Revised nomenclature of *C. pyloridis*". *Int. J. Syst. Bacteriol*. 37:68.
 59. Marshall B. J, McGeachie D. B, Rogers P. A, Glancy R. J. 1985. Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med. J. Aust*. 142:439–444.
 60. Marshall B. J, Warren J. R. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration". *Lancet*. i:1311–1315.
 61. Martínez S G. 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno". *Rev Cubana Farm*. 39:3
 62. Mc kee T. y Mc Kee JR. Bioquímica, las bases moleculares de la vida. 3ª edición. Mc Graw Hill. Interamericana. 2003.

63. Megraud F, Neman-Simha V, Brugmann D. 1992. Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells. *Infect Immun.* 60: 1858-1863.
64. Megraud F, Brassens-Rabbe M P, Denis F., Belbouri A., Joa D Q. 1989. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1870-1873.
65. Morton DJ, Whitby PW, Jin H, Ren Z, Stull TL. 1999. Effect of multiple mutations in the hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding proteins, HgpA, HgpB, and HgpC, of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun.* 67:2729-39.
66. Murray L J, McCrum E E, Evans A E, Bramford K B. 1997. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection among 4742 randomly selected subjects from Northern Ireland". *Int J Epidemiol.* 26: 880-887
67. Nagata H, Ikawa Y, Kuboniwa M, Maeda K, Shizukuishi S. 2002. Characterization of hemoglobin binding to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Anaerobe.* 2002. 8:109-14.
68. Neilands JB. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem.* 270:26723-6.
69. O'Toole P. W, Lane M. C., and Porwollik S. 2000. *H. pylori* motility. *Microbes Infect..* 2:1207–1214.
70. Olivares D. y J. P. Gisbert. 2006. Factores implicados en la patogenia de la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid).* 98:374-386.
71. Osato M S, Ayub K, Le HH, Reddy R, Graham D Y. 1998. Houseflies are unlikely reservoir of vector for *H. pylori*". *J Clin Microbiol.* 36:2786-2788.
72. Ottemann K M, Lowenthal A C. 2002. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection". *Infect Immun.* 70: 1984-1990.
73. Parsonnet J, and Isaacson P. G. 2004. Bacterial infection and MALT lymphoma". *N. Engl. J. Med.* 350:213–215.

74. Pasternack RF, Gibbs EJ, Mauk AG, Reid LS, Wong NM, Kurokawa K, Hashim M, Muller-Eberhard U. 1985. Kinetics of hemoprotein reduction and interprotein heme transfer. *Biochem.* 24:5443-8.
75. Pearson A. D, Bamforth J, Booth L, Holdstock G, Ireland A, Walker C, Hawtin P., Millward-Sadler H. 1984. Polyacrylamide gel electrophoresis of spiral bacteria from the gastric antrum". *Lancet.* ii:1349–1350.
76. Perez-Perez G I, Salomaa A, Kosunen T U, Daverman B. 2002. Evidence that cagA+ *H. pylori* strains are disappearing more rapidly than cagA- strains. *Gut.* 50:295-298.
77. Pérez-Pérez GI, Israel DA. 2000. Role of iron in *Helicobacter pylori*: its influence in outer membrane protein expression and in pathogenicity. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 12:1263-5.
78. Perkins-Balding D., M. T. Baer and I. Stojiljkovic 2003. Identification of functionally important regions of a haemoglobin receptor from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology.* 149:3423–3435
79. Pollitt E. 1991. Effects of a diet deficient in iron on the growth and development of preschool and school age children. *Food Nut Bull.* 13: 110-118.
80. Raymond Kenneth N., Dertz Emily A., and Sanggou S. Kim. 2003. Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *PNAS* 100: 3584–3588.
81. Rivas-Traverso Francisco, Francisco Hernández. 2000. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed;* 11:187-205.
82. Rossi MS, Fetherston JD, Letoffe S, Carniel E, Perry RD, Ghigo JM. 2001. Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* 69:6707-17.
83. Schalk IJ, Yue WW, Buchanan SK. 2004. Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. *Mol Microbiol.* 54:14-22.
84. Scott D, Weeks D, Melchers K, Sachs G. 1998. The life and death of *Helicobacter pylori*. *Gut.* 43 Suppl 1:S56-60..
85. Senkovich Olga, Ceaser Shantelle, McGee David J., and Testerman Traci L.

2010. Unique Host Iron Utilization Mechanisms of *Helicobacter pylori* Revealed with Iron-Deficient Chemically Defined Media". *Infection and immunity*. 78(5):1841–1849.
86. Sigler PB, Xu Z, Rye HS, Burston SG, Fenton WA, Horwich AL. Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:581-608.
 87. Simpson W, Olczak T, Genco CA. 2000 Characterization and expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*. 182:5737-48.
 88. Steer H. W, Colin-Jones D. G. 1975. Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium". *Gut*. 16:590–597.
 89. Stingl K, Altendorf K, and Bakker E. P. 2002. Acid survival of *H. pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis?. *Trends Microbiol*. 10:70–74.
 90. Stingl K, Altendorf K, Bakker EP.. 2002. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis?. *Trends Microbiol*. 10:70-4.
 91. Stojiljkovic I, Srinivasan N. 1997. Neisseria meningitidis tonB, exbB, and exbD genes: Ton-dependent utilization of protein-bound iron in Neisseriae. *J Bacteriol*. 179:805-12.
 92. Tame JR, van Dooren SJ, Oudega B, Otto BR. 2002. Characterization and crystallization of a novel haemoglobinase from pathogenic *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 58:843-5.
 93. Taneera J, A. P. Moran, S. O. Hynes, H. O. Nilsson, W. Al-Soud, and T. Wadstrom. 2002. Influence of activated charcoal, porcine gastric mucin and beta-cyclodextrin on the morphology and growth of intestinal and gastric *Helicobacter* spp. *Microbiology*. 148:677–684
 94. Taylor D E, Blazer M J. 1991. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev*. 13: 42-59
 95. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush

- J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 388:539-47.
96. Torres AG, and Payne SM. 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol*. 23:825-33.
 97. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gómez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R. 1998. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico". *J Infect Dis*. 178(4): 1089-1094.
 98. Uzel C, Conrad M E. 1998. Absorption of heme iron". *Semin Hematol*. 35:27-34.
 99. Velayudhan J, Hughes NJ, McColm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC, Kelly DJ. 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol Microbiol*. 37:274-86.
 100. Veldhuyzen van Zanten, S. O. J, M. F. Dixon, and A. Lee. 1999. The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and *Helicobacter* ecology". *Gastroenterology*. 116:1217–1229.
 101. Waidner Barbara, Greiner Stefan, Odenbreit Stefan, Kavermann Holger Velayudhan, Jyoti, Staehler Frank, Guhl Johannes, Bisse Emmanuel, Arnoud H. M. van Vliet, Simon C. Andrews, Johannes G. Kusters, David J. Kelly, Rainer Haas, Manfred Kist, and Stefan Bereswill. 2002. Essential Role of Ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* Iron Metabolism and Gastric Colonization. *Infect. Immun*. 70: 3923–3929.
 102. Waidner Bijlsma JJ, B, Vliet AH, Hughes NJ, Hag S, Bereswill S, Kelly DJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Kist M, Kusters JG. 2002. The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun*. 70:606-11.

103. Wandersman C, Delepelaire P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol.* 58:611-47.
104. Wandersman C, Stojiljkovic I. 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol.* 3:215-20.
105. Weiss G. 2009. Iron metabolism in the anemia of chronic diseases. *Biochem Biophys Acta.* 1790: 682-693.
106. Worst DJ, Otto BR, de Graaff J. 1995. Iron-repressible outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* involved in heme uptake. *Infect Immun.* 63:4161-5.
107. Worst DJ, Gerrits MM, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. 1998. *Helicobacter pylori* ribBA-mediated riboflavin production is involved in iron acquisition. *J Bacteriol.* 180:1473-9.
108. Worst DJ, Maaskant J, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. 1999. Multiple haem-utilization loci in *Helicobacter pylori*. *Microbiology.* 145:681-8.
109. Yamaoka Y, S. Kikuchi, H. M. el-Zimaity, O. Gutierrez, M. S. Osato, and D. Y. Graham. 2002. Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology.* 123:414–424.
110. Zorrilla GA, Eirez IM y Izquierdo EM. 2004. Papel de los radicales libres sobre el ADN: Carcinogénesis y terapia antioxidante. *Rev Cubana Invest Biomed.* 23:1-6.

VIII. APÉNDICE

1. Soluciones.

Acrilamida 30% (1 l)	290g Acrilamida 10g Bis-acrilamida Disolver en 60 ml de H ₂ O Aforar, filtrar y guardar en frasco ambar a 4°C
Azul de Coomassie (100 ml)	0.29g de azul de Coomassie Disolver con agitación en 90 ml de solución v:v metanol H ₂ O y añadir 10 ml de ácido acético glacial Filtrar con papel Whatman
Amortiguador de corrida para proteínas 2X (10 ml)	2.5 ml de Tris-HCl 100mM pH 6.8 4 ml SDS 10% 2 ml Glicerol 200 µl DTT 1M 0.1 mg azul de bromofenol Disolver agitando en 1° ml de H ₂ O, alícuotar y guardar a T. A
Amortiguador de transferencia 1X para proteínas (1 l)	100 ml Tris-glicina 10X 200 ml Metanol Aforar con ddH ₂ O
DTT 1M (100 ml)	15.45 g de DTT Aforar con ddH ₂ O, alícuotar y guardar a -20°C
EDTA 0.5M pH 8.0 (100 ml)	18.612g de EDTA Disolver en H ₂ O, aforar, ajustar pH con NaOH 10M, guardar a T. A

PBS 1X pH 7.0 (1 l)	8 g (137 mM) NaCl 0.2 g (2.7 mM) KCl 1.44 g (10 mM) NaHPO 0.24 g (2mM) KHHPO 800 ml ddH ₂ O Ajustar pH a 7.0 con HCl Aforar a 1 l.
PBST	100 ml de PBS 1X 50 ml Tween 20 Disolver con agitación suave
PSA	1g PSA Disolver en 10 ml de H ₂ O, alicuotar en tubos eppendorf y guardar a -20°C
SDS 10% (1 l)	100g SDS Disolver en 900 ml de H ₂ O, calentar a 68°C, aforar, alicuotar y guardar a T. A
Solución desteñidora (100 ml)	30 ml Etanol 10 ml Acido acético Aforar con ddH ₂ O
TAE 50X (1 l)	242g Tris-Base 57.1 ml acido acético glacial 100 ml EDTA 0.5M (pH 8) Mezclar, disolver en H ₂ O, aforar y guardar a T. A

2. Publicaciones.

Durante el doctorado se realizó la siguiente publicación.

González-López MA, Velázquez-Guadarrama N, Romero-Espejel ME, Olivares-Trejo Jde J. 2013. *Helicobacter pylori* secretes the chaperonin GroEL (HSP60), which binds iron. *FEBS Lett.* Jun 19;587(12):1823-8. doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.048. Epub 2013 May 16.

Helicobacter pylori secretes the chaperonin GroEL (HSP60), which binds iron



Marco Antonio González-López^a, Norma Velázquez-Guadarrama^b, María Elena Romero-Espejel^{a,c}, José de Jesús Olivares-Trejo^{a,*}

^a Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, San Lorenzo 290, Col Del Valle, C.P. 03100, México D.F., México

^b Laboratorio de Bacteriología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez 162, México D.F., México

^c Departamento de Infectología y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Avenida IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México D.F. 07360, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2013

Revised 6 April 2013

Accepted 26 April 2013

Available online 16 May 2013

Edited by Miguel De la Rosa

Keywords:

Iron uptake

Iron acquisition

Chaperonin

Haem-affinity chromatography

Helicobacter pylori

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a bacterium that can use multiple iron sources. However, it is unknown whether this bacterium secretes molecules such as siderophores or haemophores to scavenge iron. Here, we report the first secreted iron-binding protein of *H. pylori*, which we purified by haem-affinity chromatography. Mass spectrometry analysis revealed its identity as chaperonin (HpGroEL). When we compared HpGroEL with EcGroEL from *Escherichia coli*, they were homologous, showing 60% similarity. Additionally, purified cytoplasmic HpGroEL could also bind iron. Perhaps *H. pylori* secretes HpGroEL to maintain the appropriate folding of extracellular proteins and to bind iron.

© 2013 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1824

MA. González-López et al./FEBS Letters 587 (2013) 1823–1828

2. Materials and methods

2.1. Bacterial growth conditions

H. pylori J99 (ATCC 700824) and *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 700927) strains were used in this study. *H. pylori* strain J99 was routinely grown at 37 °C on blood agar plates (Casman agar containing 7.5% sheep blood) under microaerophilic conditions (10% CO₂) for 24 h at 37 °C before being grown on Casman agar plates containing 5 mM FeCl₃ for 12 h at 37 °C under microaerophilic conditions (10% CO₂).

E. coli O157:H7 strain EDL 933 was grown on Luria–Bertani agar plates for 12 h at 37 °C, after which the bacteria were again grown on Casman agar plates containing 5 mM FeCl₃ for 12 h at 37 °C.

2.2. Isolation of secreted, total and cytoplasmic proteins

Both bacterial strains were grown on Casman agar plates supplemented with 5 mM FeCl₃, collected, suspended in Brucella Broth and cultivated for 12 h. Cells were then centrifuged at 6000×g for 10 min, and the supernatant was filtered through a 0.45-μm pore size membrane filter to remove residual bacteria from the supernatant containing secreted proteins. Cells were washed three times with Brucella Broth by centrifugation at 6000×g for 10 min and were finally resuspended in medium supplemented with 1 mM PMSF and 1% sarkosyl. Bacteria were lysed by sonication for 6 min with pulses of 30 s. To eliminate intact cells, samples were centrifuged at 12000×g for 20 min. The supernatant was considered to contain total proteins. To isolate cytoplasmic proteins, this supernatant was ultracentrifuged at 105000×g for 1 h at 4 °C, and the resulting supernatant was considered to contain cytoplasmic proteins [11].

(3% Na₂CO₃, 0.0004% Na₂S₂O₅·5H₂O and 40 μL of 37% formaldehyde). The gel was gently agitated until the bands appeared, at which point the reaction was stopped by adding 5% glacial acetic acid and incubating for 10 min. The concentration of proteins was determined by spectrophotometry using the Bradford method; a standard curve was generated using bovine serum albumin. The concentration of proteins, read at 595 nm in a spectrophotometer, was determined by interpolation. For Coomassie blue-stained 10% SDS–PAGE, 50 μg of protein was loaded onto gels, while for silver staining, 5 μg of protein was loaded.

2.5. Western blotting

No bacterial lysis occurred when bacteria were cultivated for 12 h. *H. pylori* and *E. coli* were cultivated for only 12 h to prevent cell lysis [15]. A Western blot was performed using anti-β-galactosidase antibodies as an internal control to verify that no intracellular proteins were released under our culture conditions. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes in a semi-dry trans-blot cell for 1 h at 100 mA in a solution of 30 mM Tris and 20% methanol. The membranes were soaked in PBST buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ and 0.1% Tween 20) containing 5% non-fat milk overnight to saturate all remaining active binding sites. The membranes were washed three times with PBST and then incubated with anti-GroEL antibody (Enzo Life Sciences) (1:40000) or with anti-β-galactosidase antibody (Millipore) (1:50000) for 1 h. Five washes were performed with PBST, and the secondary antibody was added (anti-rabbit coupled to horseradish peroxidase; 1:10000) [12]. Both antibodies were specific for *E. coli* proteins but cross-react with homologous proteins from *H. pylori* [16].

2.6. Competition experiments

2.3. Purification of proteins by affinity chromatography

Secreted, total or cytoplasmic proteins were loaded onto affinity chromatography resin coupled to haem (Sigma). The interaction was maintained overnight at 4 °C. The resin was centrifuged at 1000×g for 1 min, the flow-through was collected and the resin was washed four times with wash buffer at pH 7.0 (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl) to eliminate unspecific interactions. Proteins bound to the haem were released with 6 M guanidine hydrochloride. The samples were cleaned of salts, lipids and nucleic acids by precipitation using a kit (Cleanup kit, Bio-Rad). Salts and other contaminants remained in the supernatant, and the proteins were recovered in the pellet.

2.4. Protein quantification and Coomassie brilliant blue staining

The proteins resolved on gels and used for subsequent mass spectrometry analysis were visualised by a Coomassie brilliant blue R-250 method; the gel was immersed in a staining solution (0.1% Coomassie brilliant blue R-250, 50% methanol and 10% glacial acetic acid) for 15 min with gentle agitation and then destained in a destaining solution (40% methanol and 10% glacial acetic acid) until the gel background was fully clear. When the silver staining method was used, the gel was immersed in a fixing solution (40% ethanol, 5% glacial acetic acid) overnight, and then a fixing step was performed. The gel was washed twice (20 min each) with 50% ethanol and three times with deionised water for 5 min. The gel was then pre-treated (0.02% Na₂S₂O₅ for 2 min) and washed three times in deionised water for 20 s. The gel was stained with a staining solution (0.2% AgNO₃ and 40 µL of 37% formaldehyde) for 30 min and washed two times (distilled water) for 20 s. The result was revealed by incubating the gel in developing solution

Competition experiments were performed identically to affinity chromatography purification, but the proteins bound to the haem-affinity resin were released with haem, FeCl₃ 6H₂O, ZnCl₂, MnCl₂·4H₂O, MgCl₂ 6H₂O, CaCl₂, vitamin B₁₂ and Lf. The eluents (except guanidine hydrochloride) had a concentration that was twofold greater than the iron concentration of the haem-affinity resin. Each sample (5 µg) was subjected to SDS-PAGE.

2.7. Mass spectrometry analysis

After destaining the Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel, the band corresponding to 58 kDa was cut, washed with deionised water and enzymatically digested with trypsin. LC-MS/MS was performed on a Micromass QToF I equipped with an LC Packings nanoflow LC. The digested solution (5 µL) was injected onto an LC Packings C18 PepMap column (0.75 µm × 15 cm) and eluted with a linear acetonitrile gradient at a flow rate of 200 nL/min. The peptides eluting from the column were introduced into the mass spectrometer through a new objective PicoTip held by a new objective adapter. The experimental conditions were as follows: capillary voltage 1.8 kV, cone voltage 32 V and collision energy from 14 to 50 eV according to the mass and charge of the ion. Raw data files were processed using the MassLynx ProteinLynx software, and pkl files were submitted for searching at www.matrixscience.com using the Mascot algorithm (Protein Core Facility, Columbia University Medical Center, <http://www.cumc.columbia.edu/dept/protein/>).

2.8. Amino acid sequence alignment

The amino acid sequence of the HpGroEL protein (from *H. pylori* J99) was compared with GroEL protein sequences from other bacteria (*Helicobacter pylori* 26695, *Helicobacter pylori* HPGA1,

Table 1

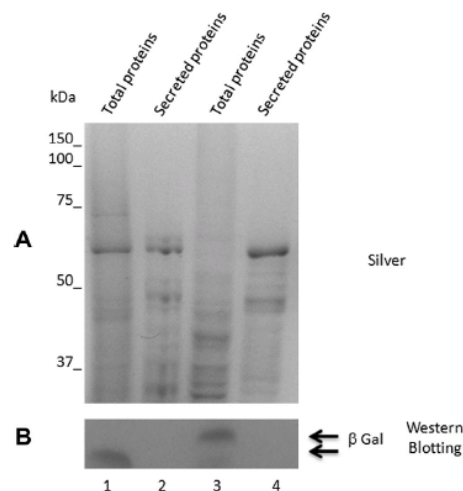
The 58-kDa band of *H. pylori* was identified by mass spectrometry as the chaperonin GroEL. The search parameters were as follows: type of search, MS/MS ion search; enzyme, trypsin; fixed modifications, carbamidomethyl (C); variable modifications, acetyl (N-term) and oxidation (M); mass values, monoisotopic; protein mass, unrestricted; peptide mass tolerance, ±1.2 Da; fragment mass tolerance, ±0.6 Da; maximum missed cleavages, 2; instrument type, default; number of queries, 101; and database, SwissProt.

Accession number	Protein name	Coverage	Mass (kDa/pI)	Mascot score	Unique peptide	Function
Q9ZN50	60 kDa chaperonin (GroEL)	39%	58.26/5.5	1116	24	Prevents misfolding and promotes the refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions

Table 2

List of bacterial species and the UniProt access numbers for their GroEL proteins, which were used to perform the alignment in Fig. 4.

Bacteria	GroEL Accession number/UniProt
<i>H. pylori</i> J99	Q9ZN50
<i>H. pylori</i> 26695	P42383
<i>H. pylori</i> HPGA1	Q1CVE5
<i>H. felis</i>	E7ACQ3
<i>H. muselae</i>	D3UGP1
<i>H. hepaticus</i>	Q7U317
<i>E. coli</i> O157:H7	P0A6F7
<i>B. anthracis</i>	C3L507
<i>B. avium</i>	Q2KXZ3
<i>C. botulinum</i>	A7FYP3
<i>H. influenzae</i>	E3GVP9
<i>K. pneumoniae</i>	A6TH53
<i>N. meningitidis</i>	P57006
<i>P. aeruginosa</i>	P30718
<i>S. typhi</i>	P0A1D4
<i>S. dysenteriae</i>	Q328C4
<i>S. pneumoniae</i>	P0A336
<i>V. cholerae</i>	Q9KNR7
<i>Y. pestis</i>	Q8Z1Y3

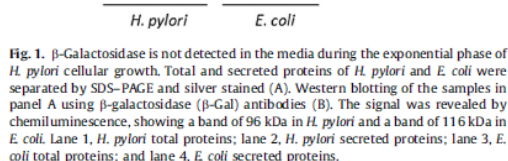


Helicobacter felis, *Helicobacter mustelae*, *Helicobacter hepaticus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus anthracis*, *Bacillus avium*, *Clostridium botulinum*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis* (Table 2), which were submitted to the server at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> to obtain an alignment. The histidine and tyrosine residues were bolded using the program JalView 2.8. To obtain the 3-D structure of HpGroEL and EcGroEL, the amino acid sequences of both proteins were used as a query for Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). They were then submitted to the CPHmodels 3.2 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) to obtain the PDB file. This file was used to construct 3-D models of both proteins in PyMol 0.9.

3. Results

3.1. *H. pylori* secretes a protein with affinity for haem

It has been reported that *H. pylori* can undergo autolysis when it reaches the stationary phase of cellular growth [15], thereby contaminating the media with cytoplasmic proteins. To avoid such contamination, we cultivated this bacterium for only 12 h to guarantee exponential growth and to prevent cellular autolysis [17]. The bacterium *E. coli* was used as a control, and both total and secreted proteins from both bacteria were resolved by SDS-PAGE (Fig. 1A); the presence of the β -galactosidase (β -Gal) protein was detected by Western blot. This protein [16] was found in total protein samples (Fig. 1B, lanes 1 and 3) but not in secreted protein samples (Fig. 1B, lanes 2 and 4). These results indicated that the



bacteria were not lysed. For all experiments, *H. pylori* was cultivated on Casman agar supplemented with 5 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. This medium was selected because it did not contain proteins that bound the haem-affinity chromatography resin (Casman agar, Becton Dickinson) (Fig. 2B). To see if *H. pylori* secreted proteins to scavenge iron, we loaded the total secreted proteins of *H. pylori*, cultivated on Casman agar and supplemented with 5 mM FeCl_3 , onto haem-affinity chromatography resin (Fig. 2A, lane 1). The flow-through (Fig. 2A, lane 2) and four washes (lanes 3–6) were collected; proteins attached to the resin were then eluted with guanidine hydrochloride (lane 7). In this fraction, a protein of approximately 58 kDa (obtained by RF calculation) was observed. This protein was tightly bound to the resin, as eluting it required that we increase the stringency of the elution to 6 M guanidine hydrochloride.

3.2. A 58-kDa protein secreted by *H. pylori* binds iron

H. pylori secretes a 58-kDa protein that binds haem; however, this protein might bind iron or the tetrapyrrolic ring. To determine

1826

MA. González-López et al./FEBS Letters 587 (2013) 1823–1828

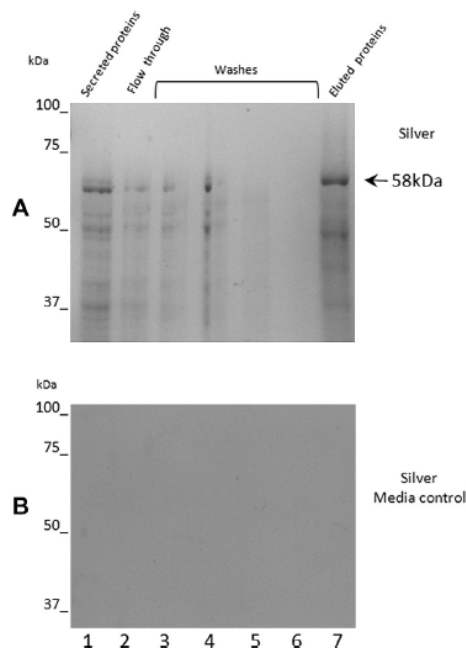


Fig. 2. *H. pylori* secretes a protein that binds haem-affinity chromatography resin. *H. pylori* proteins secreted during growth on Casman medium were purified by haem-affinity chromatography, and samples of each fraction were visualised by SDS-PAGE and silver staining (A). Uninoculated Casman medium was used as a negative control (B). Lane 1, secreted total proteins; lane 2, flow-through; lanes 3–6, washes; and lane 7, elution with guanidine hydrochloride.

if the 58-kDa protein from *H. pylori* binds iron, we attached the protein to haem-affinity chromatography resin, but in place of guanidine chloride (Fig. 3A, lane 1), we used haem (Fig. 3A, lane 2) or $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fig. 3A, lane 3) to elute. In all cases, the protein was eluted. The elution with iron showed that this protein recognised iron but perhaps not the tetrapyrrolic ring. To test this possibility, the elution was performed with vitamin B_{12} , which contains a tetrapyrrolic ring similar to haem but with cobalt rather than iron at its centre. Vitamin B_{12} was unable to elute the 58-kDa protein (Fig. 3A, lane 4), suggesting that this protein binds the iron rather than the tetrapyrrolic ring. To further test this hypothesis, we used another iron-containing molecule. If is a protein that contains two molecules of iron, and it released the 58-kDa protein from the haem-affinity resin (Fig. 3A, lane 5). To probe the protein's specificity for iron, we used the other ions ZnCl_2 (Fig. 3C, lane 3), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Fig. 3C, lane 4), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fig. 3C, lane 5) and CaCl_2 (Fig. 3C, lane 6); in all cases, the 58-kDa protein was not eluted. Together, these results showed that the 58-kDa protein secreted by *H. pylori* was eluted only with iron. As a control, eluents were subjected to SDS-PAGE (Fig. 3B and D).

3.3. The 58-kDa protein secreted by *H. pylori* is a chaperonin (HpGroEL)

To identify the 58-kDa protein, mass spectrometry analysis was performed. The band was cut from the Coomassie-stained gel and digested with trypsin. Analysis with the Mascot program revealed 24 unique peptides that matched the chaperonin HpGroEL of *H. pylori* (Q9ZN50 UniProt). The coverage was 39%, and this protein has an isoelectric point of 5.5 and a molecular weight of 58.26 kDa (Table 1). Our interpretation of these results is that HpGroEL is secreted by *H. pylori* to fold proteins and to bind iron.

3.4. HpGroEL is homologous to EcGroEL and has a similarity of 60%

To discover whether the HpGroEL protein is different from previously reported chaperonins, an alignment was performed using

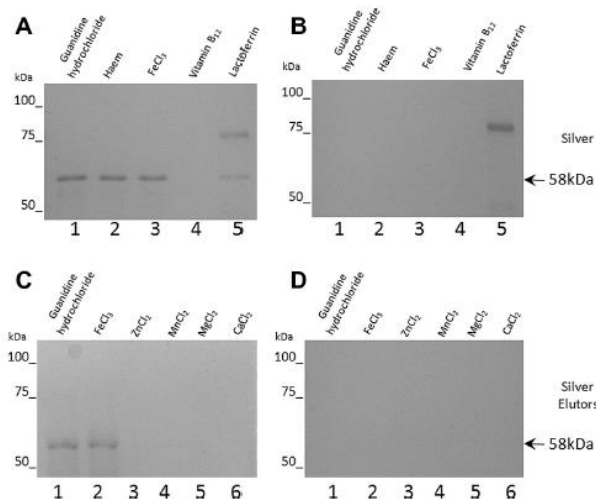


Fig. 3. The *H. pylori* 58-kDa protein specifically binds molecules containing iron. Secreted proteins were loaded onto haem-affinity chromatography resin and eluted with different iron sources (A): lane 1, guanidine chloride; lane 2, haem; lane 3, FeCl_3 ; lane 4, vitamin B_{12} ; and lane 5, lactoferrin. The protein was also eluted with non-iron ions (C): lane 1, guanidine chloride; lane 2, FeCl_3 ; lane 3, ZnCl_2 ; lane 4, MnCl_2 ; lane 5, MgCl_2 ; lane 6, CaCl_2 . Eluents used in A, molecules containing iron (B); eluents used in C, non-iron ions (D).

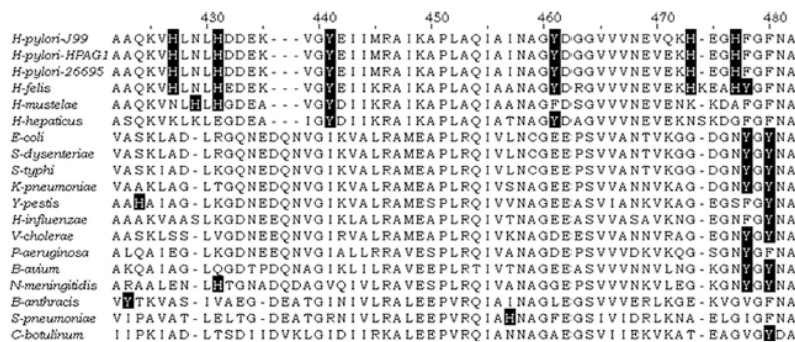
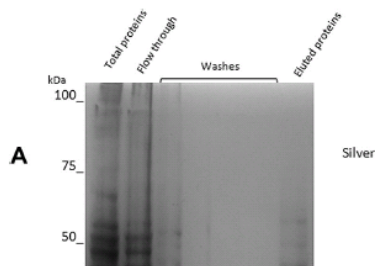


Fig. 4. Amino acid sequence alignment of the *H. pylori* GroEL protein with GroEL proteins of other bacteria (*H. pylori* 26695, *H. pylori* HPAG1, *H. felis*, *H. mustelae*, *H. hepaticus*, *E. coli* O157:H7, *B. anthracis*, *B. avium*, *C. botulinum*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *S. pneumoniae*, *V. cholerae*, *Y. pestis*). Sequences were submitted to the server at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> to obtain an alignment, and the program JalView 2.8 was used to mark the histidine and tyrosine residues.



indicated that the sequences are homologous and have approximately 60% similarity. The amino acid composition of HpGroEL likely allows it to bind iron (Fig. 4).

3.5. GroEL from *E. coli* cannot bind iron

Because there are differences in amino acid composition between HpGroEL and EcGroEL, we hypothesised that such differences confer iron-binding capacity to HpGroEL and that EcGroEL might not bind iron. To test this hypothesis, we purified EcGroEL from *E. coli* in the same way as HpGroEL and tested its iron-binding capacity (Fig. 5A). This experiment clearly showed that EcGroEL purified from *E. coli* did not bind iron; therefore, EcGroEL has dif-

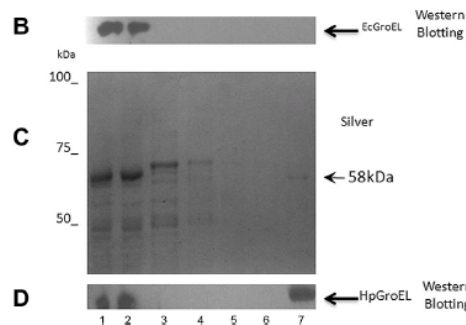


Fig. 5. EcGroEL does not bind haem-affinity chromatography resin. Total proteins from *E. coli* were loaded onto haem-affinity chromatography resin to purify EcGroEL. After affinity chromatography, samples of each fraction were separated by SDS-PAGE (A). Western blotting of the samples in panel A using anti-EcGroEL antibodies was performed (B). The purification was also performed using the cytoplasmic proteins of *H. pylori* (C); the respective Western blot is shown (D). The results were revealed by chemiluminescence. Lane 1, total proteins; lane 2, flow-through; lanes 3–6, washes; and lane 7, eluted proteins.

the GroEL amino acid sequences of *H. pylori* 26695, *H. pylori* HPAG, *H. felis*, *H. mustelae*, *H. hepaticus*, *E. coli* O157:H7, *B. anthracis*, *B. avium*, *C. botulinum*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *S. pneumoniae*, *V. cholerae* and *Y. pestis* (Table 2) with the ClustalW server. The alignment

ferent characteristics from HpGroEL (Fig. 5A). To confirm that the EcGroEL protein was present, Western blotting was performed on all the fractions. Anti-EcGroEL antibodies revealed the presence of EcGroEL in the total extract and flow-through, but not among the proteins corresponding to the elution fractions (Fig. 5B). This result verified that the EcGroEL protein of *E. coli* is present but is incapable of binding iron. To investigate whether cytoplasmic HpGroEL in *H. pylori* cells has similar characteristics to secreted HpGroEL, we purified cytoplasmic HpGroEL from *H. pylori*. The result clearly showed that HpGroEL binds haem-affinity resin just as secreted HpGroEL does (Fig. 5C). The identity of cytoplasmic HpGroEL was confirmed by Western blotting with anti-GroEL antibodies (Fig. 5D), which clearly showed a 58-kDa protein in the elution fraction (Fig. 5D, lane 7). Therefore, both secreted and cytoplasmic HpGroEL can bind iron.

4. Discussion

Iron acquisition is key for the growth of *H. pylori* in the human stomach. Approximately 8 proteins involved in iron uptake have been found in the *H. pylori* membrane, and perhaps they are related to a direct uptake mechanism that does not involve protein secretion. Interestingly, here, we present the first protein secreted by *H. pylori* that binds iron, which was identified by mass spectrometry as a chaperonin (HpGroEL) with a molecular weight of 58.26 kDa. We believe that this protein is the same as that found by Vanet and Labigne [16], who reported an estimated size of 60 kDa; this small molecular weight difference may be because they did not perform the same precise calculations we did. We were able to purify HpGroEL using haem-affinity chromatography. Remarkably,

elution with iron and another alternative iron source (Lf) showed that HpGroEL bound iron but not such ions as Zn, Mn, Mg or Ca. Our results also argue that the tetrapyrrolic structure is not recognised by HpGroEL, as vitamin B₁₂ did not release HpGroEL from haem-affinity resin. Although we demonstrated that HpGroEL bound iron, we propose that its expression is not regulated by iron because HpGroEL production did not require eliminating iron from the media. Normally, the expression of membrane receptors that bind iron sources such as Lf [9], Hb [8] or haem [10] requires adding a chelating agent [9]. The capacity to bind iron is a specific characteristic of HpGroEL, as the corresponding EcGroEL protein of *E. coli* did not bind iron. The 3-D models of both proteins, visualised with the PyMol program, showed that they are structurally conserved and that histidine (H) and tyrosine (Y) amino acid residues are distributed through their structures (Supplementary Fig. 7). Although we were unable to identify which amino acid residues are involved in iron binding (such an analysis would require crystallising the HpGroEL protein), we propose that the iron-binding property of HpGroEL is due to its additional 7 H and 2 Y residues compared to the other proteins included in the amino acid alignment (Fig. 4 and Supplementary Fig. 6). This assumption is based on the fact that the HasA protein of *P. aeruginosa* [18–20] and the HasA protein of *Serratia marcescens* [21–23] have been shown by crystallisation to bind iron sources using H and Y residues. Our results collectively suggest that this protein is a secreted chaperonin that binds iron. For this reason, we propose that *H. pylori* secretes proteins to withstand the extreme environment present in the stomach. For instance, this pathogen expresses urease [24] to maintain an alkaline microenvironment in contrast to the acidic stomach. Together with urease, this bacterium also must secrete chaperonins such as HpGroEL and HpGroES [16]; however, the HpGroEL chaperonin has the special characteristic of binding iron. Although it is known that *H. pylori* secretes HpGroES, we doubt that this chaperonin binds iron, as we were unable to purify it by haem-affinity chromatography. All of these results represent the first effort to explain the importance of indirect iron acquisition by *H. pylori*. Perhaps iron helps the bacterium to resist the acidic

- [3] Wandersman, C. and Stojiljkovic, I. (2000) Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 215–220.
- [4] Genco, C.A. and Dixon, D.W. (2001) Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbiol.* 39, 1–11.
- [5] Simpson, W., Olczak, T. and Genco, C.A. (2000) Characterization and expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 182, 5737–5748.
- [6] Murphy, E.R., Sacco, R.E., Dickenson, A., Metzger, D.J., Hu, Y., Orndorff, P.E. and Connell, T.D. (2002) BhuR, a virulence-associated outer membrane protein of *Bordetella avium*, is required for the acquisition of iron from heme and hemoproteins. *Infect. Immun.* 70, 5390–5403.
- [7] Perkins-Balding, D., Baer, M.T. and Stojiljkovic, I. (2003) Identification of functionally important regions of a haemoglobin receptor from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 149, 3423–3435.
- [8] Senkovich, O., Ceaser, S., McGee, D.J. and Testerman, T.L. (2010) Unique host iron utilization mechanisms of *Helicobacter pylori* revealed with iron-deficient chemically defined media. *Infect. Immun.* 78, 1841–1849.
- [9] Dhaenens, L., Szczepara, F. and Husson, M.O. (1997) Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 65, 514–518.
- [10] Worst, D.J., Otto, B.R. and de Graaff, J. (1995) Iron-repressible outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* involved in heme uptake. *Infect. Immun.* 63, 4161–4165.
- [11] González-López, M.A. and Olivares-Trejo, J.J. (2009) The gene frpB2 of *Helicobacter pylori* encodes a hemoglobin-binding protein involved in iron acquisition. *Biometals* 22, 889–894.
- [12] Carrizo-Chávez, M.A., Cruz-Castañeda, A. and de J. Olivares-Trejo, J. (2012) The frpB1 gene of *Helicobacter pylori* is regulated by iron and encodes a membrane protein capable of binding haem and hemoglobin. *FEBS Lett.* 586, 875–879.
- [13] Velayudhan, J., Hughes, N.J., McColm, A.A., Bagshaw, J., Clayton, C.L., Andrews, S.C. and Kelly, D.J. (2000) Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* 37, 274–286.
- [14] Dhaenens, L., Szczepara, F., Van Nieuwenhuyse, S. and Husson, M.O. (1999) Comparison of iron uptake in different *Helicobacter* species. *Res. Microbiol.* 150, 475–481.
- [15] Phadnis, S.H., Parlow, M.H., Levy, M., Ilver, D., Caulkins, C.M., Connors, J.B. and Dunn, B.E. (1996) Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect. Immun.* 64, 905–912.
- [16] Vanet, A. and Labigne, A. (1998) Evidence for specific secretion rather than autolysis in the release of some *Helicobacter pylori* proteins. *Infect. Immun.* 66, 1023–1027.
- [17] Mathai, E., Cafferkey, M., Keane, C. and O'Morain, C. (1992) Evaluation of different solid media used for cultivation of *Helicobacter* (Campylobacter) *pylori*. *Indian J. Med. Res.* 95, 23–25.
- [18] Alontaga, A.Y., Rodríguez, J.C., Schönbrunn, E., Becker, A., Funke, T., Yuki, E.T., Hayashi, T., Stobaugh, I., Moenne-Loccoz, P. and Rivera, M. (2009) Structural

environment present in the human stomach, and it may be vital for *H. pylori* during the infective process.

Acknowledgements

This work was supported by CONACyT grant number SALUD-2010-01-139945 and SALUD-2012-01-181641. Ph.D. studentship BI-080530175442 granted by ICyT-DF agreement ICyT/179/2011. We are grateful for grant number ICyTDF/328/2011.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfebslet.2013.04.048>.

References

- [1] Andrews, S.C., Robinson, A.K. and Rodríguez-Quiriones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215–237.
- [2] Wandersman, C. and Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 611–647.
- [3] Yuki, E.T., Jepkorir, G., Alontaga, A.Y., Pautsch, L., Rodriguez, J.C., Rivera, M. and Moëne-Loccoz, P. (2010) Kinetic and spectroscopic studies of heme acquisition in the hemophore HasAp from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 49, 6646–6654.
- [4] Krieg, S., Huché, F., Diederichs, K., Izadi-Pruneyre, N., Lacroisey, A., Wandersman, C., Delepelaire, P. and Welte, W. (2009) Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 1045–1050.
- [5] Lukat-Rodgers, G.S., Rodgers, K.R., Cailliet-Saguy, C., Izadi-Pruneyre, N. and Lacroisey, A. (2008) Novel heme ligand displacement by CO in the soluble hemophore HasA and its proximal ligand mutants: implications for heme uptake and release. *Biochemistry* 47, 2087–2098.
- [6] Wolff, N., Deniau, C., Létoffé, S., Simenel, C., Kumar, V., Stojiljkovic, I., Wandersman, C., Delepierre, M. and Lacroisey, A. (2002) Histidine pK(a) shifts and changes of tautomeric states induced by the binding of gallium-protoporphyrin IX in the hemophore HasA(SM). *Protein Sci.* 11, 757–765.
- [7] Evans Jr., D.J., Evans, D.G., Engstrand, L. and Graham, D.Y. (1992) Urease-associated heat shock protein of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 60, 2125–2127.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 1 de Octubre del 2013, en la Ciudad de México, D. F., para optar al Grado de Doctor en Ciencias Genómicas, al M. en C. Marco Antonio González López.

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Dra. Elizbeth Álvarez Sánchez

Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga.

Dr. Javier Hernández Sánchez
