

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UACM

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA QUE UNE
HEMOGLOBINA HUMANA EN *Helicobacter pylori***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

Q. F. B. MARCO ANTONIO GONZÁLEZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ DE JESÚS OLIVARES TREJO

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2008

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 Angélica Oviedo de Anda
Investigadora Asociada C. Unidad de investigación en Biología del Desarrollo
Centro Médico siglo XXI

Dr. Serafín Vivanco Domínguez
Departamento de Genética y Biología Molecular
CINVESTAV-IPN

Dra. Mavil López Casamichana
Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

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

Dra. Selene Zarate Guerra
Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Mauricio Castañón Arreola
Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio 1 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 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México). (Proyecto numero 54212 de Ciencia Básica)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por darme la oportunidad, el apoyo y el espacio para desarrollarme.

Agradezco a mi comité tutorial por su orientación, enseñanzas, y críticas ofrecidas en la realización de este trabajo.

A mi familia porque es lo mas importante para mi.

A mis padres, porque gracias a su ejemplo y cariño sigo avanzando en mi vida

A mis hermanos, porque son una fuente de inspiración, y no importan los retos siempre van hacia delante.

A mi esposa Altagracia porque siempre ha estado conmigo y ha comprendido lo que representa para mí la ciencia. Sin ella seguramente no estaría escribiendo esto.

A mis Amigos, porque son un apoyo en los tiempos difíciles y por eso son amigos, especialmente a mi mejor amigo José Luis.

A mis compañeros porque siempre estuvieron animándome y ayudándome.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1 Importancia del hierro en los seres vivos	1
1.2 Proteínas que unen hierro libre	2
1.3 Proteínas que unen el grupo hemo (hemoproteínas)	3
1.4 La adquisición de hierro por los patógenos	3
1.4.1 A. Sideróforos	4
1.4.2 B. Hemóforos	5
1.4.3 C. Receptores	5
1.4.3.1 Receptores para sideróforos	5
1.4.3.2 Receptores para hemóforos	5
1.4.3.3 Receptores para transferrina y lactoferrina	6
1.4.3.4 Receptores para hemo y hemoproteínas	6
1.5 Mecanismo de acción de los receptores para grupo hemo y hemoproteínas	8
1.5.1 Sistema TonB	9
1.5.2 Transportador tipo ABC	10
1.6 Método de estudio de los mecanismos de adquisición de hierro a partir de Hb	11
1.7 <i>H. pylori</i> y la adquisición de hierro	13

2. ESTADO DEL ARTE

3. ANTECEDENTES PARTICULARES

4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL TEMA

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

2. OBJETIVOS PARTICULARES

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Identificación de secuencias dentro del genoma de <i>H. pylori</i> que codifican para probables proteínas que unen hemoglobina.	21
1.1 Análisis <i>in silico</i>	21

2. Analizar la capacidad de unión de Hb humana por parte de la proteína expresada	22
2.1 Crecimiento de <i>E. coli</i>	22
2.2 Crecimiento de <i>H. pylori</i>	22
2.3 Obtención de DNA genómico	22
2.3.1 Obtención de DNA genómico de <i>E. coli</i>	22
2.3.2 Obtención de DNA genómico de <i>H. pylori</i>	23
2.4 Amplificación de genes por PCR	24
2.4.1 <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i>	24
2.5 Clonación de los productos de PCR	24
2.6 Descripción del vector de expresión pJET 1.2 Blunt	24
2.7 Células competentes	25
2.8 Transformación de células competentes	26
2.9 Obtención de DNA plasmídico	26
2.10 Geles de agarosa	27
2.11 Selección de clonas candidatas	27
2.12 Confirmación del gen insertado	27
2.13 Caracterización por enzimas de restricción de los plásmidos	27
2.14 Determinación del sentido del inserto clonado en el vector pJET.2Blunt	28
2.15 Secuenciación	28
2.16 Expresión de las proteínas recombinantes	28
2.17 Obtención de proteínas de la fracción membranal y solubles	29
2.18 Preparación de muestras para electroforesis en SDS-PAGE	29
2.19 Electroforesis en SDS-PAGE	29
2.20 Pruebas de unión a Hb	30
2.20.1 inmovilización de proteínas	30
2.20.2 Ensayo de Overlay. Prueba de unión entre las proteínas sobreexpresadas y Hb.	30
3. Evaluación de la función de la proteína codificada por la secuencia seleccionada	31
3.1 Prueba de funcionalidad	31
3.1.1 Curva de crecimiento	31

V. RESULTADOS

1. Identificar secuencias dentro del genoma de <i>H. pylori</i> que codifiquen para probables proteínas que unen hemoglobina	33
2. Analizar la capacidad de unión de Hb humana por parte de la proteína FprB2	41
2.1 Obtención de DNA genómico de <i>E. coli</i> EC EH O157:H7 y de <i>Helicobacter pylori</i> J99	41
2.2 Productos de PCR	43
2.3 Selección de clonas candidatas	45

2.4. Confirmación del inserto por PCR	47
2.5 Caracterización con enzimas de restricción de los plásmidos pChuA, pFrpB2 y p976	49
2.5.1 Caracterización del plásmido pChuA	49
2.5.2 Caracterización del plásmido pFrpB2	53
2.5.3 Caracterización del plásmido p976	57
2.6 Secuenciación de los plásmidos pChuA y pFrpB2	59
2.6.1 Secuenciación del plásmido pChuA	59
2.6.2 Secuenciación del plásmido pFrpB2	61
2.7 Overlay de la fracción soluble	63
2.8 Overlay de la fracción membranal	65
3. Evaluación de la función de la proteína FrpB2	67
3.1 Prueba de funcionalidad	67
3.1.1 Curvas de crecimiento	67
 VI. DISCUSIÓN	 72
 VII. CONCLUSIONES	 76
 VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de la enterobactina y ferricromo	4
Figura 2	Estructura tridimensional resuelta por cristalografía del hemóforo HasA de <i>S. marcescens</i> unido a un grupo hemo	5
Figura 3	Alineamiento de proteínas que unen hemoglobina, grupo hemo y hemoproteínas	7
Figura 4	Modelo hipotético de un receptor de hemoglobina HmbR de <i>N. meningitidis</i>	8
Figura 5	El esquema representa el mecanismo de acción de receptores para hemóforos y hemoproteínas	10
Figura 6	Proteínas de la fracción soluble y membranal de células <i>E. coli</i> transformadas y que sobreexpresan la proteína HmuR	12
Figura 7	Curva de crecimiento	13
Figura 8	Curva de crecimiento de <i>H. pylori</i> .	15
Figura 9	Extractos membranales de <i>H. pylori</i>	15
Figura 10	Tinción en plata de proteínas de <i>H. pylori</i>	17
Figura 11	Modelo de obtención de hierro a partir de hierro-dicitrato	17
Figura 12	Estrategia experimental empleada en este proyecto	20
Figura 13	Esquema del vector pJET1.2Blunt	25
Figura 14	Alineamiento de las proteínas que unen hemoglobina de la bacteria <i>E. coli</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>P. gingivalis</i> y <i>N. meningitidis</i>	34
Figura 15	Alineamiento de las proteínas que unen hemoglobina y las localizadas en el proteoma de <i>Helicobacter pylori</i>	36
Figura 16	Modelaje tridimensional de las proteínas que unen Hb y de FrpB2 de <i>H. pylori</i>	38
Figura 17	Modelo tridimensional de las proteínas <i>E. coli</i> ChuA y FrpB2 de <i>H. pylori</i>	40
Figura 18	DNA genómico sobre gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio	42
Figura 19	Amplificados de PCR de los genes <i>chuA</i> de <i>E. coli</i> EC EH O157:H7 y <i>frpB2</i> de <i>H. pylori</i>	44
Figura 20	Clonas candidatas	46
Figura 21	Productos de PCR empleando los plásmidos como templado	48
Figura 22	Caracterización con enzimas de restricción del plásmido pChuA	52
Figura 23	Caracterización con enzimas de restricción del plásmido pFrpB2	56
Figura 24	Caracterización con enzimas de restricción del plásmido p976	58

Figura 25	Secuenciación y traducción del gen <i>chuA</i> en el plásmido pChuA	60
Figura 26	Secuenciación y caracterización del gen <i>frpB2</i> clonado en el plásmido pFrpB2	62
Figura 27	Coomassie y Overlay de la fracción soluble de células BL21PLys transformadas con el plásmido pChuA, pFrpB2 y p976.	64
Figura 28	Coomassie y Overlay de la fracción membranal de células BL21PLys transformadas con el plásmido pChuA, pFrpB2 y p976	66
Figura 29	Curvas de crecimiento	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Proteínas que unen hierro libre	2
Tabla 2	Proteínas que unen el grupo hemo	3
Tabla 3	Esquema aplicado a las células BL21pLys y células BL21pLys transformadas con los plásmidos p976, pChuA y pFrpB2	32
Tabla 4	Secuencias de oligos empleados para la amplificación de los genes	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Proteínas tipo Cassette Binding
ATP	Adenosina Tri fosfato
ABS	Albúmina Sérica Bovina
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	Deoxinucleótidos tri fosfatados
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ácido Etilén Diamino Tetra Acético
g	Gramos
h	Horas
Hb	Hemoglobina
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranososa
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria Broth
mM	Mili molar
m	Minutos
μ g	Microgramos
mL	Mililitros
ng	Nanogramos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pM	Picomolar
s	Segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TAE	Buffer Tris Acetato EDTA
TEMED	N, N, N', N'', Tetra Metilen Diamina
xg	Gravedades

RESUMEN

El hierro es esencial para todos los microorganismos que infectan a hospederos mamíferos. En el humano el hierro se encuentra unido a proteínas como la lactoferrina o hemoproteínas porque el hierro libre es altamente tóxico. Por lo que los organismos patógenos han desarrollado mecanismos para adquirir hierro de diferentes fuentes dentro del humano. Un mecanismo eficiente es la expresión de proteínas capaces de unir hemoglobina (receptores para hemóforos y hemoglobina). Los hemóforos son secretados por la célula y son capaces de unir proteínas como la hemoglobina, mientras que los receptores de hemoglobina son proteínas ancladas a la membrana de la bacteria. Estas proteínas pueden internalizar los grupos hemo provenientes de la hemoglobina mediante un mecanismo dependiente de TonB. Los receptores de hemoglobina se unen a ésta usando dos dominios conservados llamados FRAP y NPFL. Alineamientos múltiples de proteínas capaces de unir hemoglobina, provenientes de diferentes bacterias muestran que son divergentes pero conservan estos dominios.

Helicobacter pylori es un patógeno que causa úlcera peptídica y gastritis, puede sobrevivir en varios medios dentro del humano pero requiere de hierro para lograrlo. Además el hierro es considerado como un factor de virulencia. Se ha propuesto que *H. pylori* puede obtener hierro de diferentes fuentes dentro del humano. Uno de estos es la holotransferrina donde la adquisición de hierro es mediada por una proteína de membrana. El mecanismo de adquisición de hierro a partir de hemoglobina no han sido dilucidados, sin embargo tres proteínas han sido aisladas por cromatografía de afinidad y son capaces de unirse al grupo hemo pero la identidad de estas proteínas permanece desconocida. Por otro lado se sabe que *H. pylori* es capaz de obtener hierro a partir de hemoglobina porque en un medio suplementado con hemoglobina como única fuente de hierro es capaz de crecer. No obstante los mecanismos para adquirir hierro a partir de hemoglobina no han sido determinados. En consecuencia, la lactoferrina puede ser usada cuando la bacteria se encuentra en las mucosas, mientras que la Hb puede ser utilizada por *H. pylori* cuando se presenta úlcera peptídica hemorrágica. En el presente trabajo, se identificó el gen *frpB2* que codifica para una proteína de membrana que une hemoglobina. La proteína fue encontrada mediante un análisis *in silico* del genoma de *H. pylori* en la base de datos NCBI utilizando la secuencia *chuA* de *E. coli* como sonda. El gen fue clonado, expresado en *E. coli* y se probó su habilidad de obtener hierro a partir de hemoglobina. La proteína expresada fue localizada en membranas y fue capaz de unir Hb. Así, esta proteína puede estar involucrada en el mecanismo de adquisición de hierro a partir de Hb en *H. pylori*.

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1 Importancia del hierro en los seres vivos

El hierro es un elemento que se encuentra en dos estados de oxidación, Fe^{3+} o Fe^{2+} , este catión es esencial para los seres vivos debido a que es un cofactor de las proteínas hierro azufre y además funciona como un agente reductor en reacciones de oxido reducción en la célula como es el caso del transporte de electrones, la atracción de oxígeno, la reducción de peróxidos, la síntesis de DNA, aminoácidos y nucleótidos. (Horton y col; 2002).

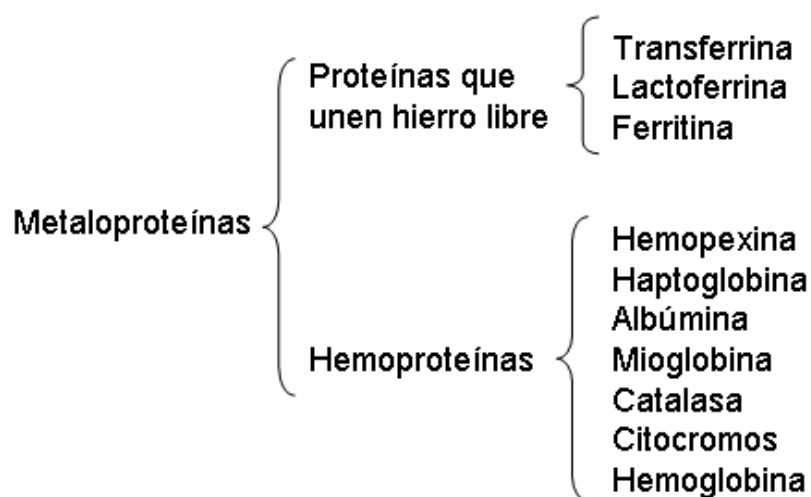
El hierro no sólo es importante por las funciones mencionadas, sino también porque un exceso de este elemento puede causar serias consecuencias a los organismos. Por ejemplo un exceso de la forma reducida (Fe^{2+}) da lugar a la generación de formas reactivas de $\text{OH}^\cdot$. Los radicales libres dañan a los ácidos nucleicos, aminoácidos y ácidos grasos. (Wandersman y col; 2004).

En el caso de los ácidos nucleicos, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque del $\text{OH}^\cdot$, lo que da lugar a la ruptura del esqueleto azúcar fosfato, a la modificación de las bases nitrogenadas y a la formación de uniones cruzadas (Zorrilla y col; 2004).

Con respecto a los aminoácidos, el $\text{OH}^\cdot$ genera daños puntuales a proteínas al oxidar a los aminoácidos, principalmente a 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 col; 2006).

En las membranas celulares, la interacción del OH^- con los ácidos grasos polinsaturados provoca daño oxidativo celular, cuya consecuencia es una menor fluidez de la membrana. (Martínez; 2005)

Debido a estos efectos nocivos, el hierro no se encuentra de manera libre y necesita ser almacenado. En el ser humano, como en otros seres vivos, el hierro se almacena en proteínas especializadas llamadas metaloproteínas. El cuadro 1 se muestra la clasificación de las metaloproteínas que unen hierro libre o acoplado al grupo hemo.



Cuadro 1. Clasificación de las metaloproteínas

1.2 Proteínas que unen hierro libre

En la tabla 1 se muestran las principales características de las 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

Tabla 1. Proteínas que unen hierro libre

1.3 Proteínas que unen el grupo hemo (hemoproteínas)

En la tabla 2 se muestran las principales características de las 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	Varia dependiendo del tipo de citocromo	Membrana citoplasmática, mitocondrial	Transporte de energía
Hb	68	Eritrocitos	Transporta O_2 y CO_2

Tabla 2. Proteínas que unen el grupo hemo

1.4 La adquisición de hierro por los patógenos

Las bacterias patógenas necesitan el hierro para llevar a cabo su proceso infeccioso (Liu y col; 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 col; 2003). Por lo tanto las bacterias han desarrollado una serie de mecanismos a través de los cuales obtener hierro.

La adquisición de hierro se realiza por medio de alguno de los siguientes mecanismos: (Wandersman y col; 2004, Genco y col; 2001).

A. Sideróforos

B. Hemóforos

C. Receptores

Sideróforos
Hemóforos
Lactoferrina
Ferritina
Hemo y Hb

Las bacterias gram negativas se valen, de por lo menos, dos de estos mecanismos.

1.4.1 A. 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 (figura 1), (Schalk y col; 2004).

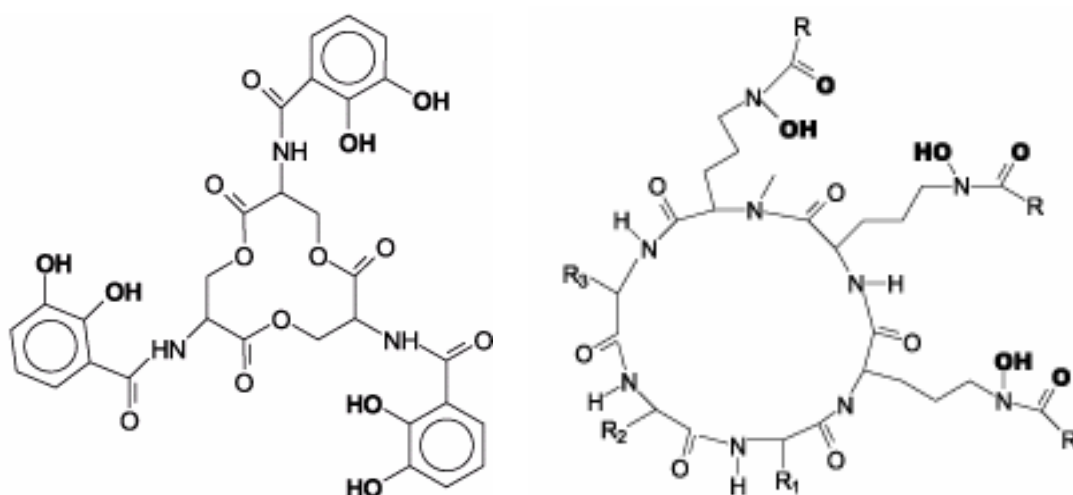


Figura 1. Estructura de la enterobactina y ferricromo. Tomado de Andrews y col; 2002

1.4.2 B. Hemóforos

Estas proteínas se localizan exclusivamente en las bacterias gram negativas y 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 (figura 2).



Figura 2. Estructura tridimensional resuelta por cristalografía del hemóforo HasA de *S. marcescens* unido a un grupo hemo. Tomado de Protein Data Bank 1dk0.

1.4.3 C. Receptores

1.4.3.1 Receptor para sideróforos

Una vez que se ha formado el complejo sideróforo- Fe^{3+} , el complejo es demasiado grande para pasar a través de las 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 0.1-100nM) (Andrews y col; 2003).

1.4.3.2 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 col; 2004).

1.4.3.3 Receptores para transferrina y lactoferrina

Los receptores para transferrina y lactoferrina han sido identificados en las bacterias patógenas como *Neisseria*, *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 col; 2002).

1.4.3.4 Receptores de hemo y hemoproteínas

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

Los lineamientos de proteínas, que tienen la capacidad de unir Hb, han permitido detectar dominios que se encuentran conservados a pesar de que el resto de la proteína es divergente, estos dominios se denominan FRAP y el NPNL, por su secuencia (figura 3).

CHUA	432...	QA FRAP TMGEMYNDKHF	SIGRFYTN			NPNLR ETNETQE
Pg_HmuR	414	LSYAEGY YRAP SLQEMYFFFN	--HGAF	FIYG-----		NPD LKPEKSRML 453
Hd_HupA	686	AKYATG FRAP TSDEIYFVFQ	--HPSFSIYP	-----		NLYT KAERRSKN 726
Hi_HhuA	755	AKYGA FRAP TSDEIYFTFL	--HPDFSIRP	-----		NRDI QAETTAKT 794
Vv_HupA	466	TQISQG FRAP SFNELYTYDNFGHGYTN	-----			RP NPNL ESEKKSLS 507
Vc_HutA	454	AQISQG FRAP DFQELYYSFGNPAHGYVF	-----			KP NPNL EAEDDSVS 495
Sd_Shua	428	GSYAQA FRAP TMGEMYNDK	--HFSIGRFY	-----TNYVVP	NPNL IRPE-TNET	472
Ye_HemR	441	GSYAQA FRAP TMGEMYNDK	--HFSMNIMG	--NTLTNYVVP	NPNL KPE-TNET	488

Figura 3. 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 dominios FRAP y NPNL. Tomado de Bracken y col; 1999

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

Las regiones funcionales del receptor HmbR de *N. meningitidis* se han identificado y se ha propuesto un modelo hipotético que posee regiones intracelulares, transmembranales y asas extracelulares de esta proteína.

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 homologos como *V. cholerae* HutA, *H. ducreyi* HgbA y *N. meningitidis* HpuB, 3 también se observaron que aminoácidos no eran conservados y 4 se determinó que regiones podrían ser giros b con el programa PEPLOT. El modelo que se realizó también se baso en estructuras cristalográficas de los sideroforos FepA y FhuA

Para confirmar este 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 col; 2003) (figura 4).

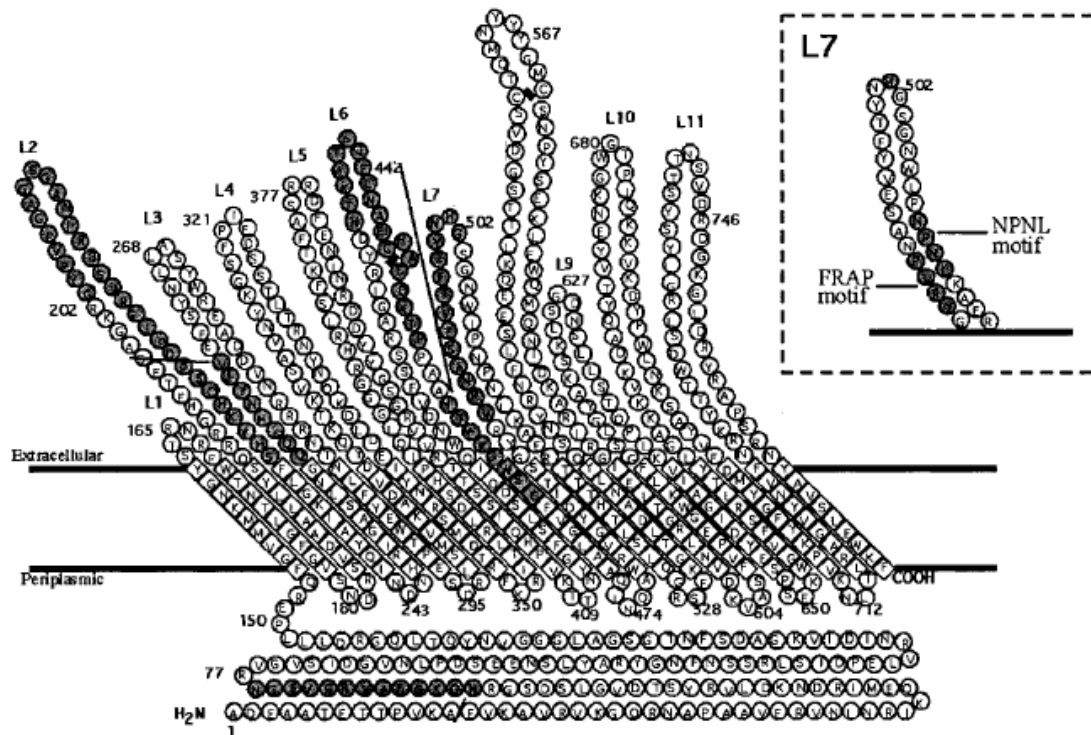


Figura 4. Modelo hipotético de un receptor de Hb HmbR de *N. meningitidis*, en el recuadro se muestra el asa 7 donde se localizan los dominios FRAP y NPNL. Tomado de Perkins-Balding y col; 2003.

1.5 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 col; 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 col; 1999), en *E. coli* se ha visto que la proteína Hbp puede degradar Hb (Otto y col; 1998).

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 col; 2001). La unión de la Hb con su receptor debe seguirse 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 cual es proporcionada por el sistema TonB (véase mas abajo) (Genco y col; 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 col; 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 col; 1999) (figura 5).

1.5.1 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 col; 2004).

1.5.2 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 col; 2004).

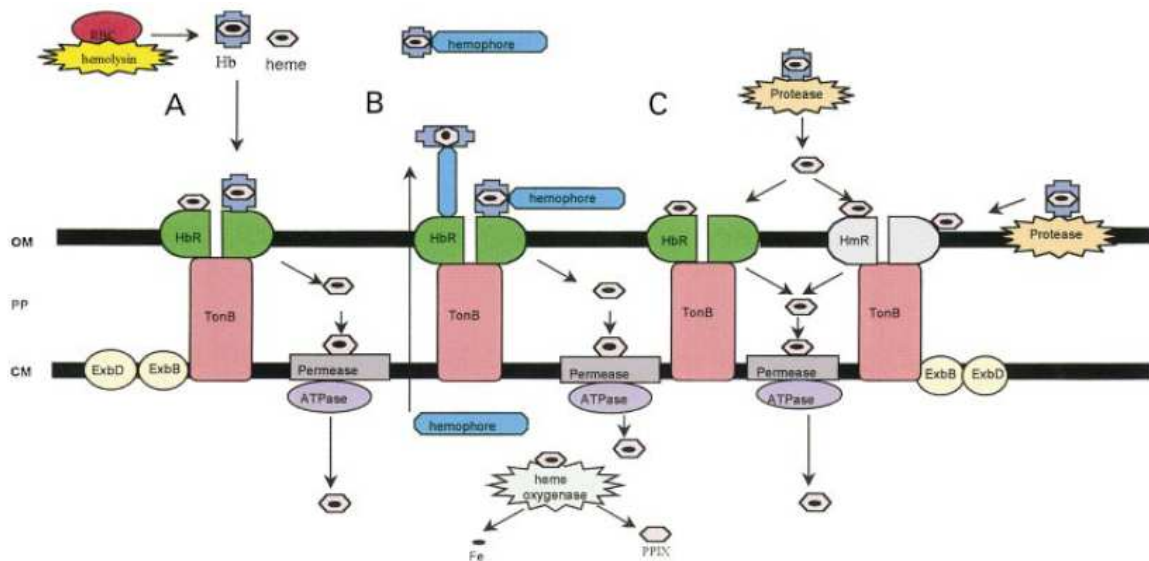


Figura 5. El esquema representa el mecanismo de acción de receptores para hemóforos y hemoproteínas

Con las 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 col; 2001.

1.6 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 con 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.

El grupo de Simpson y col, en el año 2000, determinaron en la proteína HmuR, de *P. gingivalis*, su capacidad de unir Hb y utilizarla como única fuente de hierro, para ello realizaron una prueba *in vitro* y otra *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 6, panel A). Para determinar en que fracción se sobreexpresa HmuR se realizó el western blot, 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 6, panel B). La conclusión fue que la proteína HmuR, se localiza en la fracción membranal y puede unir Hb

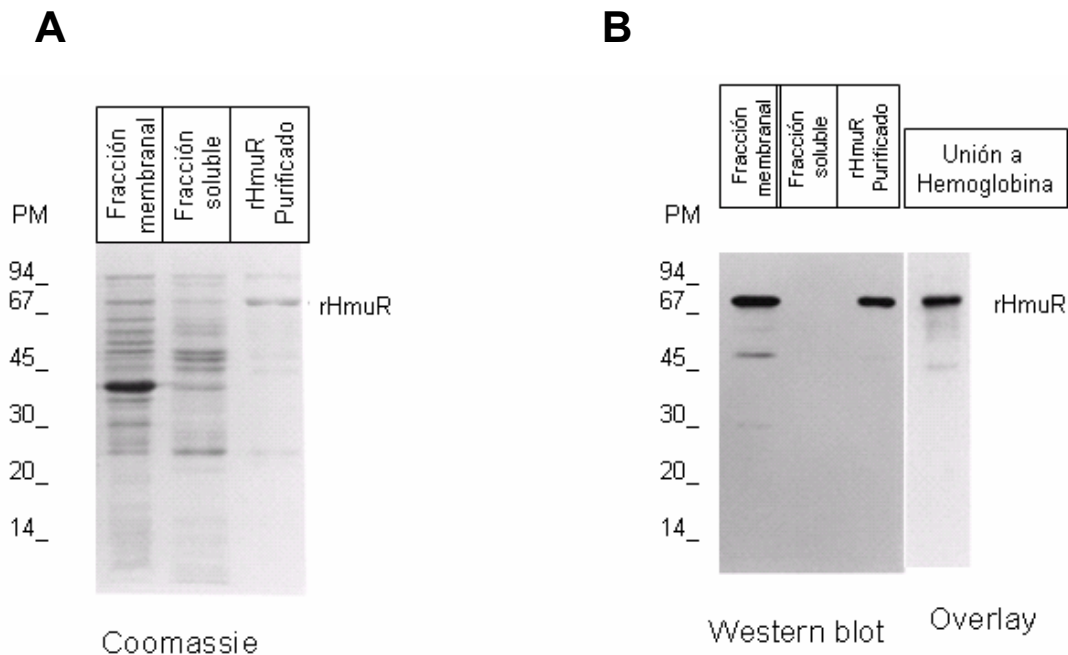


Figura 6. Proteínas de la fracción soluble y membranal de células *E. coli* transformadas y que sobreexpresan la proteína HmuR.

Panel A Coomassie de la fracción soluble, membranal y purificación de la proteína HmuR

Panel B Western blot y overlay de la proteína recombinante HmuR, se demuestra su localización membranal mediante el western blot y su capacidad de unir Hb a través del overlay. Tomado de Simpson y col; 2000

También se demostró a través de una curva de crecimiento, que es la prueba *in vivo*, si la proteína es 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 crecida en medio luria bajo diferentes condiciones.

En la figura 7 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 así poder desarrollarse.

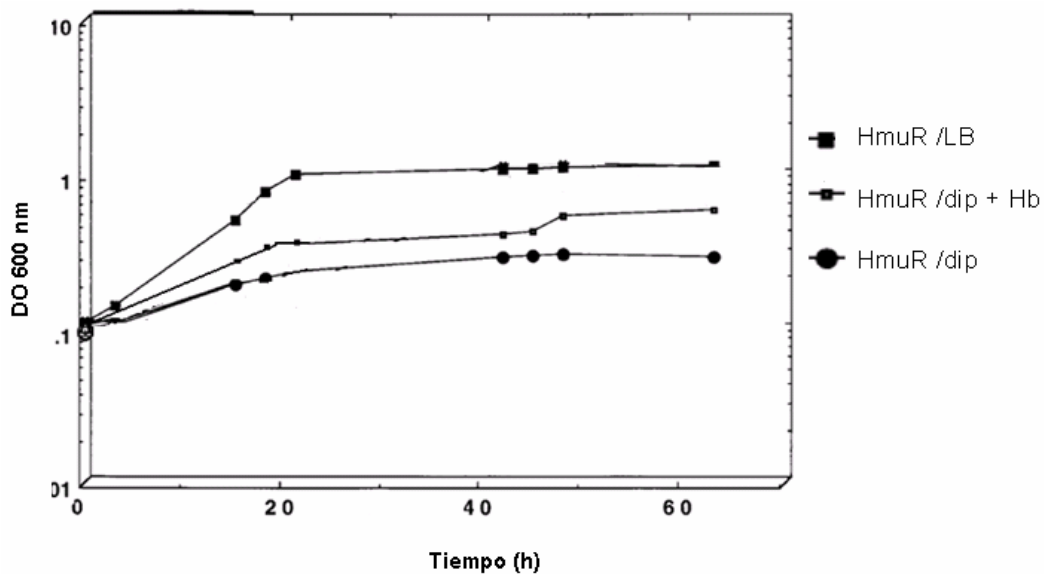


Figura 7. Curva de crecimiento, se muestra el comportamiento de las células transformadas con la proteína HmuR, crecimiento en medio luria (LB) (■), , medio luria mas 2,-2 dipirilo (●) y medio luria mas quelante y Hb (▲). Tomado de Simpson y col; 2000

Ahora bien en nuestro grupo de trabajo nos interesa saber si la bacteria patógena *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), cuenta con un mecanismo mediante el cual obtener hierro a partir de la Hb.

1.7 *H. pylori* y la adquisición de hierro.

H. pylori es una bacteria gram negativa, microaerófila, la cual coloniza únicamente a las células epiteliales de la mucosa gástrica por largos periodos de tiempo. Se sabe que infecta aproximadamente a la mitad de la población mundial, esta infección puede desencadenar padecimientos como gastritis crónica tipo B, ulceraciones peptídicas y atrofia gástrica. Además, se le conoce como un factor de riesgo, si no se trata, para desarrollar adenocarcinoma gástrico y linfoma. (Olivares y col; 2006, Rivas-Traverso y col; 2000, Beswick y col; 2006).

Esta bacteria produce un proceso infeccioso que la lleva a estar en diferentes ambientes como la mucosa gástrica y el epitelio gástrico; por lo que la bacteria se tiene que valer de diversos mecanismos de invasión. En primera instancia para colonizar el epitelio gástrico necesita atravesar la mucosa, esto lo logra por su

movimiento característico en forma de “sacacorchos”, una vez que llega al epitelio necesita unirse a estas células para evitar su remoción debido a los movimientos propios que tiene el estómago, por lo que sintetiza adhesinas de superficie, además, para sobrevivir debe evitar estar en contacto con el ácido del estómago, para ello utiliza la enzima ureasa, con la cual se crea un microambiente alcalino gracias a la hidrólisis de la urea y generación de CO_2 y NH_3 quienes son los responsables de la alcalinización del medio. Cuando *H. pylori* se encuentra bajo estas condiciones su fuente de hierro puede ser la lactoferrina (Bijlsma y col 2002), (Rivas-Traverso y col; 2000),

El rompimiento de los epitelios es otro de los sucesos que conduce a la invasión de *H. pylori*, este proceso es provocado por la citotoxina vacuolizante, y por la respuesta inmune que monta el hospedero. A este nivel *H. pylori* puede obtener hierro a partir de la ferritina (Husson y col; 1993), (Velayudhan y col; 2000).

Las hemorragias a nivel de duodeno y estómago son otros de los efectos que provoca la invasión de *H. pylori*, bajo esta circunstancia no se sabe si la Hb puede ser una fuente de hierro para esta bacteria.

2. ESTADO DEL ARTE

Se han realizado estudios con respecto a la adquisición de hierro por parte de *H. pylori* y cómo éste interviene en el metabolismo y regulación de la bacteria, en su colonización y resistencia al pH característico del estómago. (Waidner y col. 2002). La forma de adquisición de hierro es mediante receptores de Fe^{+3} -dicitrato y Fe^{2+} -ferrosina y transportadores como FeoB, que a su vez requiere de la energía proporcionada por el sistema TonB (Velayudhan y col; 2000). Una vez que se ha adquirido el hierro se explican algunos fenómenos como la colonización de la mucosa gástrica que se relaciona con el almacenamiento de hierro en la Pfr (ferritina de procariontes), y su resistencia al pH ácido que se relaciona con el gen *fur* que está involucrado en el metabolismo del hierro. (Bereswill y col; 2005).

3. ANTECEDENTES PARTICULARES

H. pylori, al igual que otros patógenos, necesita adquirir hierro de su hospedero, el cual es un fuerte determinante de la virulencia de la bacteria (Velayudhan y col; 2000). El hierro es muy insoluble en un medio acuoso y a pH neutro, sin embargo, al encontrarse en pH ácido como el del estómago, el hierro es mas soluble (Waidner y col; 2002).

H. pylori es capaz de crecer en un medio al que se le ha quelado el hierro y el cual se ha suplementado con Hb, lo que demuestra que *H. pylori* utiliza esta hemoproteína como fuente de hierro (Worts y col; 1995). *H. pylori* presenta un mejor crecimiento en la presencia de Hb, que cuando crecía solamente en medio Brucella.

La figura 8 muestra una curva de crecimiento de *H. pylori*. Al agregar el quelante de hierro (deferroxamina) a diferentes concentraciones se observa que *H. pylori* no presenta crecimiento, al agregar una fuente alterna de hierro como el citrato férrico o nitrato de hierro, no puede utilizarlos como fuentes alternas de hierro por ello no presenta crecimiento, sin embargo cuando se adiciona Hb al medio se observa que *H. pylori* es capaz de crecer, por lo que posiblemente cuneta con un mecanismo que es capaz de obtener hierro a partir de la Hb.

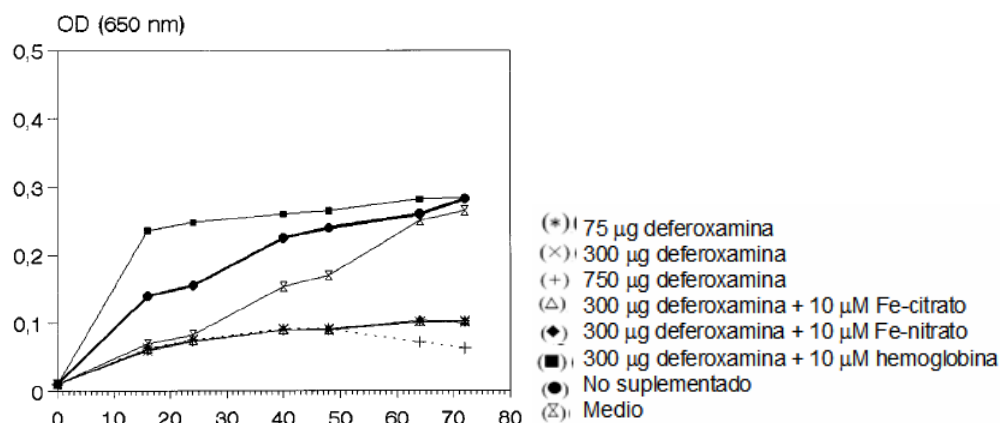


Figura 8. Curva de crecimiento de *H. pylori*, en presencia de diferentes fuentes de hierro. Tomado de Worst y col; 1995

En condiciones de ausencia de hierro *H. pylori* induce la síntesis de ciertas proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMP) (Worst y col; 1995). (figura 9)

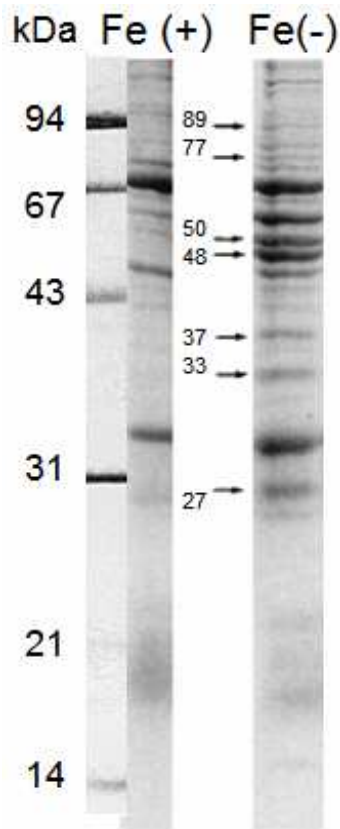


Figura 9. Extractos membranales de *H. pylori* en presencia y ausencia de hierro, las flechas indican las proteínas que se sobreexpresaron en ausencia de hierro. Tomado de Worst y col; 1995

Al purificar proteínas de membrana de *H. pylori* utilizando columna de afinidad en la que el grupo hemo era el ligando se encontraron tres proteínas que son capaces de unirse al grupo hemo, lo que sugiere que están involucradas en el mecanismo de adquisición de hierro a partir del grupo hemo (Worst y col; 1995) (figura 10).

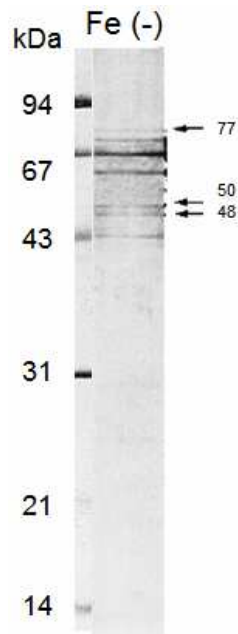
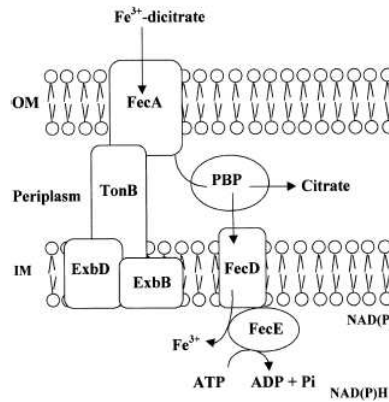


Figura 10. Tinción en plata donde se ven las proteínas, de *H. pylori* que se unen al grupo hemo. Aquellas que se sobreexpresan se identifican con flechas. Tomado de Worst col; 1995

H. pylori cuenta con el sistema TonB (TonB, ExbD y ExbB) y las permeasas tipo ABC (FecD y FecE), que podría utilizar para llevar a cabo el proceso de internalización del grupo hemo, este sistema se ha demostrado funciona en la obtención de hierro unido a dicitrato (Velayudhan y col; 2000) (figura 11).



Fe-LIMITATION

Figura 11. 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 E que son proteínas tipo ABC, para introducir el hierro-dicitrato. Tomado de Velayudhan y col; 2000.

4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL TEMA

Hasta ahora los estudios para determinar las fuentes de hierro que *H. pylori* utiliza no han sido realizados utilizando la Hb como fuente de hierro. Este estudio resulta importante debido a que *H. pylori* produce un proceso infeccioso y durante el proceso invasivo en el humano puede activar diferentes mecanismos de adquisición de hierro; uno de ellos podría ser a partir de Hb, que se podría activar al momento de las ulceraciones

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

- Identificar una proteína que une Hb humana en *H. pylori*

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar secuencias dentro del genoma de *H. pylori* que codifiquen para proteínas que posiblemente unen Hb.
- Determinar si esta proteína tiene la capacidad de unir Hb humana.
- Evaluar la función de la proteína codificada por esta secuencia.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

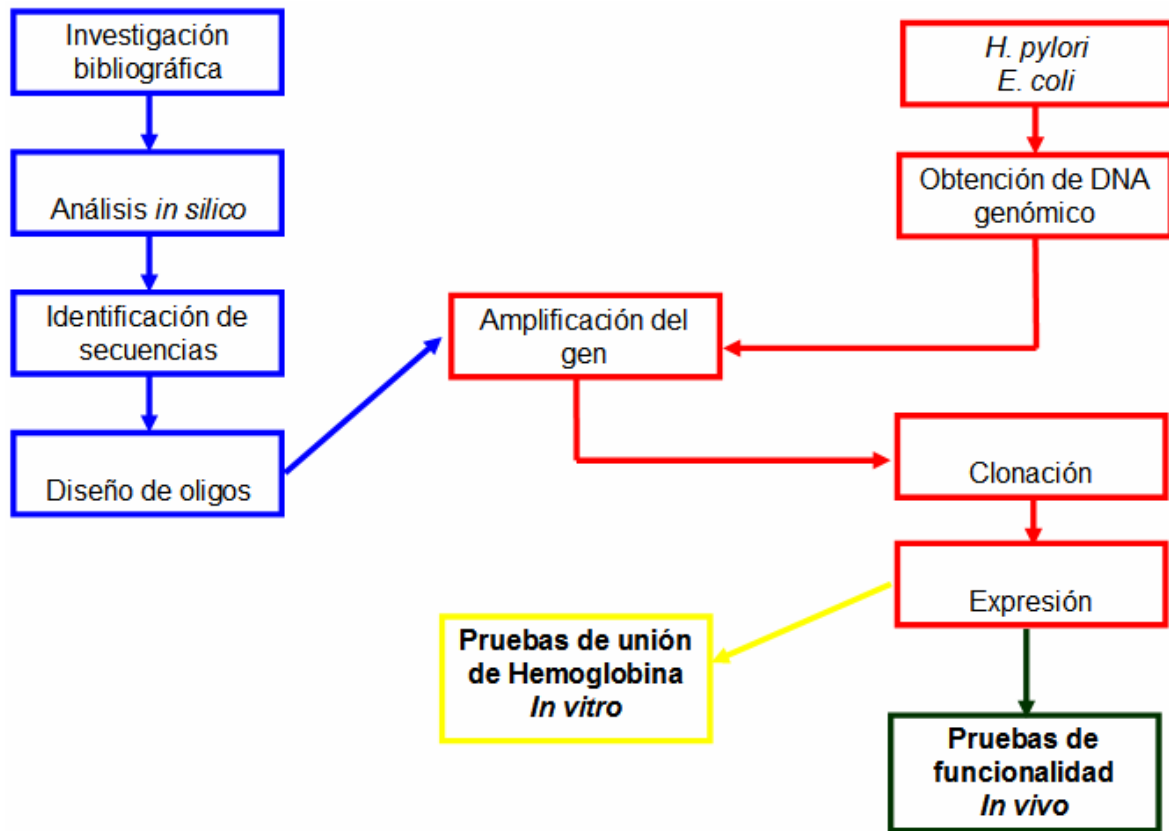


Figura 12. Estrategia experimental empleada en este proyecto

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Identificación de secuencias dentro del genoma de *H. pylori* que codifican para probables proteínas que unen Hb.

1.1 Análisis *in silico*.

Se realizó una búsqueda bibliográfica con el fin de encontrar información referente a proteínas que son capaces de unir Hb, en este análisis se encontró a varias bacterias en las que se había descrito una proteína que es capaz de unir y utilizar a la Hb como fuente de hierro, de todas ellas se seleccionó a *E. coli* EC EH O157:H7 como control positivo, por ser una bacteria en la que existen estudios previos de este fenómeno, en ella se llevaron a cabo todas las pruebas realizadas con nuestra cepa de estudio, *H. pylori* J99.

Posteriormente, se realizó una búsqueda de secuencias protéicas que contuvieran los dominios FRAP y NPNL en el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Con las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento en el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw>) para localizar estos dominios. Una vez que se encontraron los dominios FRAP y NPNL, las secuencias fueron utilizadas como sondas para encontrar secuencias semejantes dentro del proteoma de *H. pylori* mediante el empleo del programa BLASTP (<http://www.expasy.ch/tools/blast>), y nuevamente se empleó el programa ClustalW para alinear las secuencias encontradas y localizar los dominios FRAP y NPNL, también se realizó un modelaje de las secuencias encontradas con ayuda del servidor <http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels> y finalmente empleando el programa PyMol V 0.99 se hizo un modelaje tridimensional con la información obtenida.

2. Analizar la capacidad de unión de Hb humana por parte de la proteína expresada

2.1 Crecimiento de *E. coli*

La bacteria *E. coli* EC EH O157:H7, fue recuperada a partir de un congelado en glicerol, fue crecida en agar Luria, y sembrada por estría abierta e incubada a 37°C durante toda la noche, a partir de esta caja se tomó una colonia y se depositó en el medio líquido Luria creciéndose a 37°C/200 rpm durante toda la noche

2.2 Crecimiento de *H. pylori*.

H. pylori se obtuvo de un congelado en glicerol, se tomó una muestra y se sembró en agar casman suplementado con sangre de caballo al 5 %, las cajas fueron incubadas en un ambiente anaerobio que fue generado con tabletas de alka seltzer, e incubado al 37°C durante 72 h. Al cabo de este tiempo se observó el crecimiento y se realizaron nuevas resiembras bajo las mismas condiciones; de este crecimiento de *H. pylori* se tomó una muestra y fue resembrada en medio líquido TSB (Caldo Soya Tripticacina), suplementado con suero de caballo al 10 % y extracto de levadura al 1 %, que se incubó bajo las mismas condiciones.

2.3 Obtención de DNA genómico

2.3.1 Obtención de DNA genómico de *E. coli*.

Para la obtención de DNA genómico de *E. coli* se empleó el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) y se siguieron las indicaciones. En un tubo con 3 mL de medio Luria se sembró una colonia de la cepa seleccionada, se incubó por toda la noche a 200 rpm/37°C, después se adicionó 1 mL de este cultivo a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 16000 xg por 2 minutos, se descartó el

sobrenadante. Después se adicionaron 600 μ L de la solución de lisis nuclear y se resuspendió el pellet, posteriormente se incubó a 80°C por 5 minutos para lisar las células, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se adicionó 3 μ L de la solución RNasa, se invirtió el tubo hasta 5 veces para mezclar, esta solución se incubó a 37°C por 30 minutos, se enfrió a temperatura ambiente, se adicionó 200 μ L de solución precipitadora de proteínas a la muestra tratada con la RNasa, se agitó vigorosamente con el vortex por 20 segundos e incubó en hielo por 5 minutos, pasado este tiempo se centrifugó a 16000 xg, se transfirió el sobrenadante, que contiene el DNA, a un tubo eppendorf de 1.5 mL el cual debía contener 600 μ L de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló por inversión hasta que las hebras de DNA fueron visibles, se retiró el sobrenadante, se centrifugó a 16000 xg por 2 minutos, posteriormente con cuidado se retiró y se drenó el tubo sobre papel absorbente, se adicionó 600 μ L de etanol al 70 % a temperatura ambiente, se invirtió el tubo varias veces para lavar el pellet de DNA, se centrifugó a 16000 xg por 2 minutos, cuidadosamente se retiró, por aspiración, el etanol, se dejó el pellet al aire por 15 minutos, posteriormente se adicionó 100 μ L de solución rehidratante de DNA al tubo y se rehidrató el DNA por incubación a 65°C por una hora, periódicamente se mezcló invirtiendo el tubo, finalmente se almacenó el DNA a una temperatura de entre 2 y 8°C

2.3.2 Obtención de DNA genómico de *H. pylori*

La obtención de DNA genómico se llevó a cabo a partir de células crecidas en medio sólido de casman suplementado con sangre de caballo al 5 %, las células fueron resuspendidas en 1mL de solución PBS. La técnica es la misma empleada para *E. coli* a excepción de que después de la precipitación de proteínas, se incubó por 5 minutos en hielo y después se agregó 500 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, se centrifugó a 14000 rpm durante 3 minutos y se recuperó la fase acuosa que fue puesta en otro tubo al cual se le agregó 600 μ L de isopropanol frío y se dejó durante toda la noche a -20°C, al cabo de este tiempo se centrifugó y se realizaron los lavados como indica el protocolo de Promega.

2.4 Amplificación de genes por PCR

2.4.1 *E. coli* y *H. pylori*

El DNA obtenido se utilizó como templado para la amplificación del gen seleccionado.

2.5 Clonación de los productos de PCR

Los amplificados de los genes seleccionados, fueron clonados en el vector de expresión pJET1.2Blunt (Fermentas) siguiendo las indicaciones del fabricante, brevemente, en un tubo de 1.5 mL se vierte el producto de PCR 200 ng/2 μ L, enzima DNA blunting (Fermentas) 1 μ L, 10 μ L buffer de reacción 2X y agua hasta 18 μ L, se calentó a 70°C por 5 minutos, después se agregó 1 μ L del vector pJET y 1 μ L de enzima T4 DNA ligasa se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos.

Una vez que se obtuvo el plásmido este fue empleado para transformar células DH5 α competentes.

2.6 Descripción del vector de expresión pJET 1.2Blunt (Fermentas)

Este es un vector de expresión bajo el control del promotor T7, inducible por IPTG, posee un gen de resistencia a ampicilina y tiene un tamaño de 2974 pb; se proporciona en forma linearizada, como se observa en la figura 14 existe en este vector una zona en la cual se clona el amplificado de PCR. Cuando el vector se recirculariza sin producto de PCR da origen a la producción de una proteína que es tóxica para la célula (eco471R), lo cual asegura de que las células crecidas en el agar con ampicilina solo serán quienes tienen el producto de PCR clonado. El vector es clonado con un inserto de 976 pb el cual no codifica para ninguna proteína pero impide que se sintetice la proteína que es tóxica para las células por interrumpir su marco de lectura. El plásmido resultante sirvió para transformar a células DH5a y BL21pLys y utilizarlas como control (figura 13).

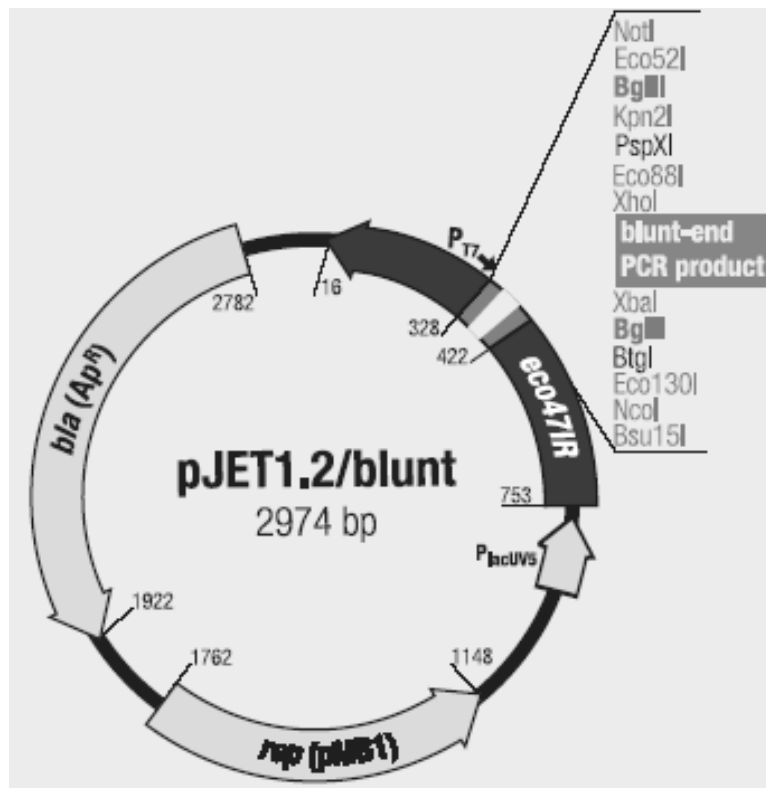


Figura 13. Esquema del vector pJET1.2/Blunt que muestra el gen de resistencia a ampicilina, el promotor T7, el gen para la proteína tóxica *eco471R*, el polilinker y el sitio de inserción del producto de PCR. Tomado de http://www.fermentas.com/profiles/kits/pdf/coa_k1231.pdf

2.7 Células competentes

Las células DH5 α y BL21pLys fueron preparadas competentes mediante la técnica de cloruro de calcio (Sambrook y col; 2001). Las células DH5 α se utilizaron con el fin de obtener un alto número de copias del plásmido y BL21pLys para sobre expresar la proteína de interés. La técnica consistió en picar una colonia proveniente de una placa e inocularla en 100 mL de caldo Luria a 37°C/200 rpm de agitación, se incubó hasta que alcanzó una densidad óptica entre 0.4 y 0.6, después se colocó en tubos a volúmenes de 50mL y se pusieron a enfriar en hielo durante 10 minutos, se centrifugó a 2700g por 10 minutos y 4°C, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 30 mL de solución fría de MgCl₂-CaCl₂ (MgCl₂ 80mM-20mM CaCl₂) con agitación vigorosa, nuevamente se recuperan las células por centrifugación a 2700g por 10 minutos y 4°C, se desechó el

sobrenadante y se resuspendió en 2 mL de solución fría de CaCl_2 0.1M por cada 50 mL de solución original, al final de este proceso las células competentes se utilizan directamente para ser transformadas.

2.8 Transformación de células competentes

Tanto las células competentes DH5 α y BI21pLys fueron transformadas con esta técnica. (Sambrook y col; 2001). 100 μL de células competentes se virtieron en un tubo de 1.5 mL y se incubó con 25 ng de plásmido en hielo durante 15 minutos, posteriormente se dio un choque térmico a 42°C por 2 minutos, rápidamente se regresó al hielo por un minutos, se agregó 1 mL de caldo luria y se incubó durante 1.5 horas a 37°C/200 rpm, después los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 minutos, el sobrenadante fue desechado a excepción de 50 mL volumen que se utilizó para resuspender el botón que quedo, una vez que se resuspendieron la células fueron sembradas en cajas de agar luria con antibiótico ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se dejo incubando a 37°C durante toda la noche.

2.9 Obtención de plásmidos

Las células DH5 α transformadas fueron tratadas con el GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit para la obtención del DNA plasmídico, se siguieron las indicaciones del fabricante. Brevemente, se hizo crecer la célula transformada en 5 mL de caldo luria hasta una densidad óptica entre 0.4 y 0.6, se centrifugó y desechó el sobrenadante, se resuspendió el botón en 250 μL de solución de resuspensión, se agregó 250 μL solución de lisis, después se neutralizó con 350 μL y centrifugó a 15000 rpm por cinco minutos, el sobrenadante se pasó a una columna y nuevamente se centrifugó a 15000 rpm por un minuto se tiró el sobrenadante y la columna se lavó tres veces y finalmente el plásmido se eluyó con 100 μL de agua miliQ.

2.10 Geles de agarosa

DNA total, los productos de PCR y el DNA plasmídico fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando amortiguador TAE (tris acetato 40mM y EDTA 1mM), y teñidos con bromuro de etidio, los geles obtenidos fueron visualizados con un transiluminador de luz UV.

2.11 Selección de clonas candidatas

Las células DH5 α transformadas, se crecieron en agar luria con ampicilina, se seleccionaron las colonias positivas que contenían el amplificado de PCR. El plásmido se extrajo y corrió en un gel de agarosa al 1%, con el fin de determinar el inserto, el plásmido se comparó la migración del plásmido vacío (control negativo), los candidatos con migración diferente se restringieron con las enzimas para liberar el inserto y se observó el tamaño. La clona candidata fue usada para transformar células BL21pLys.

2.12 Confirmación del gen insertado

Para confirmar si el inserto clonado es el que se deseaba por el diseño de los oligos, se realizó una PCR utilizando como templado los plásmidos clonados y bajo las condiciones determinadas para cada uno de los genes.

2.13 Caracterización por enzimas de restricción de los plásmidos

Los amplificados clonados en el vector pJET1.2Blunt fueron restringidos con las siguientes enzimas: *Bgl II*, *Eco RI*, *Kpn I*, *Sac I*, *Xba I*, *Xho I* y *Xma I* (Biolabs).

2.14 Determinación del sentido del inserto clonado en el vector pJET1.2 Blunt

Para dar lugar a la expresión de la proteína para la cual codifica el gen clonado, este debe estar en sentido y por las características del vector este puede quedar en sentido o no. Para determinar el sentido del inserto se elaboró el siguiente experimento:

Se analizó el inserto para determinar que enzimas lo cortaban solo una vez y que no cortaran al vector y lo mismo se realizó para el vector, al hacer una doble restricción se determinó, por el tamaño del fragmento liberado, si esta estuvo en sentido o no

2.15 Secuenciación

Para determinar que los genes clonados estuvieran en marco de lectura se realizó la secuenciación automática del fragmento clonado por fluorescencia. La reacción de secuenciación consistió en una PCR, al término de la misma las muestras fueron filtradas con la finalidad de eliminar el exceso de reactivos, y se leyeron en el equipo

2.16 Expresión de las proteínas recombinantes

Las células BL21pLys competentes fueron transformadas, así como células BL21pLys, se crecieron en agar luria con ampicilina, (a excepción de BL21pLys) a 37°C durante toda la noche. Se tomó una colonia y se creció en medio luria con ampicilina (excepto BL21pLys) a 37°C/200 rpm, durante toda la noche, a la mañana siguiente se tomó una alícuota de 50 µL, de cada tubo, y se transfirió a tubos falcón con 30 mL de medio luria, se incubó a 37°C/200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.4 y 0.6 a este tiempo se tomaron 10 mL de cada tubo y se apartaron, al medio restante se agregó IPTG a una concentración final de 1

mM, con el fin de inducir la producción de la proteína recombinante, se tomaron muestras de 5 mL a las 3 y 24 horas.

2.17 Obtención de proteínas de fracción membranal y soluble

Cada tubo se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, se deshecho el sobrenadante y se agregaron 2 mL de PBS para lavar y resuspender las células. Nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones y este paso se repitió tres veces. El botón se resuspendió en 10 mL de PBS y se agregó el inhibidor de proteasas PMSF (1 mM) (Sigma). Las células resuspendidas se lisaron en la prensa francesa, aplicando una presión de 1500 psias. Al final del proceso las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue centrifugado a 24000 rpm durante 1 hora a 4°C, se separó el sobrenadante que contiene la fracción soluble de las proteínas y el botón que contiene la fracción membranal de proteínas, fue resuspendido en 600 µL de PBS, tanto la fracción soluble como la membranal fueron resueltos sobre geles SDS-PAGE al 2 % y teñidos con azul de Coomassie.

2.18 Preparación de muestras para electroforesis en SDS-PAGE

Las proteínas de la fracción soluble y membranal fueron solubilizadas agregando buffer de muestra, se mezcló por agitación y se hirvió durante 6 minutos se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se sonicaron durante 1.50 minutos dando pulsos de 30 segundos, pausas de 10 segundos y amplitud del 60%, finalmente las muestras fueron cargadas en el gel.

2.19 Electroforesis en SDS-PAGE

Las muestras fueron analizadas en geles al 12. las proteínas son separadas en función de su peso aplicando 120 volts. Después de 1.5 horas los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (10% de ácido acético, 40% de etanol y 0.05% de

Coomassie azul brillante) durante 30 minutos, para decolorar los geles se destiñeron con una solución decolorante (30% de metanol, 10% de ácido acético en agua desionizada) durante 1 hora.

2.20 Pruebas de unión a Hb

Las proteínas resueltas en el gel SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con el fin de fijarlas para las pruebas posteriores.

2.20.1 Inmovilización de las proteínas

La transferencia de proteínas consiste en fijar las proteínas en una membrana de nitrocelulosa a través de una corriente eléctrica. Del lado negativo de la cámara se colocó en el siguiente orden, dentro de un casete; se pone una esponja, un papel whatman, y sobre este se colocó el gel de proteínas y sobre el gel la membrana de nitrocelulosa, se eliminó las burbujas de aire, se colocó otro papel whatman y finalmente otra esponja, se cierra el casete, se humedece con el buffer de transferencia (Tris-base 25mM, glicina 40 mM, SDS 0.05% y metanol al 20%) y la transferencia se corrió a 400 mA por 2 horas

2.20.2 Ensayo de overlay. Prueba de unión entre las proteínas sobreexpresadas y Hb

Se comprobó que las proteínas recombinantes unen Hb mediante un ensayo de Overlay. Después de transferir las proteínas la membrana es lavada con PBST (tween al 0.05%) 3 veces durante 15 minutos, posteriormente es bloqueada con leche al 5% por una hora, se realizó otro lavado con PBST por 15 minutos, la membrana se incubó con 50 μ g de Hb humana durante 12 horas, se lavó 3 veces con PBST durante 15 minutos, se incubó con el primer anticuerpo anti- α globina a una dilución 1:10000 con PBST durante 1.5 horas, se lavó 3 veces con PBST durante 15 minutos, se incubó con el 2º anticuerpo anti-conejo a una dilución

1:7500 con PBST durante 1.5 horas, se lavó 3 veces con PBST por 15 minutos y dos lavados mas de 10 minutos con PBS; esta membrana fue revelada por quimioluminiscencia.

El ensayo de quimioluminiscencia se realizó con kit ECL (Amersham), las membranas se bañaron con esta solución durante 3 minutos en un cuarto oscuro y con luz roja, se eliminó el exceso y la membranas se cubrieron con un plástico, finalmente se pusieron encima placas autorradiográficas a diferentes tiempos de exposición, al cabo de los cuales las placas fueron reveladas y fijadas

3. Evaluación de la función de la proteína codificada por la secuencia seleccionada

3.1 Prueba de funcionalidad

3.1.1 Curvas de crecimiento

Las células BL21pLys que fueron transformadas con los plásmidos p976, pChuA y pFrpB2 así como las células BL21pLys se les realizó una curva de crecimiento. Una colonia de cada cepa fue incubada en 5mL de medio luria con ampicilina a excepción de BL21pLys que solo se creció en medio luria porque carece del gen de resistencia a ampicilina. Se incubaron a 37°C/200 rpm hasta alcanzar un densidad óptica entre 0.4 y 0.6, de cada cepa se tomaron 20 µL y se vertieron en tubos falcón de 50 mL los cuales contenían 30 mL de medio luria y ampicilina excepto para las células BL21pLys, para cada cepa se siguió el siguiente esquema de pruebas para la curva de crecimiento:

Cada cepa contó con 5 tubos con las siguientes condiciones:

Tubo 1. Es el tubo control donde las células crecen en un medio enriquecido y solo se agregó IPTG, se espera observar el crecimiento normal de las células y que el IPTG no interfiere en este desarrollo.

Tubo 2. Al medio se le agregó el quelante de hierro 2,-2 dipirilo, se indujo con IPTG y se agregó Hb. En este tubo se observó si la célula es capaz de obtener hierro a partir de Hb.

Tubo 3. Al medio se le agregó el quelante de hierro 2,-2 se indujo con IPTG y se agregó hierro. En este tubo se observó si las células son capaces de emplear una fuente alterna de hierro para su desarrollo.

Tubo 4. Al medio se le agregó el quelante de hierro 2,-2 dipirilo, se indujo con IPTG.

Tubo 5. A este tubo solo se agregó el quelante de hierro 2,-2 dipirilo.

Tubo	Tubo	Tubo
1. -----	1. IPTG	1. -----
2. 2,-2 Dpirilo	2. IPTG	2. Hb 4.5 μ M
3. 2,-2 Dpirilo	3. IPTG	3. Fe 10 mM
4. 2,-2 Dpirilo	4. IPTG	4. -----
5. 2,-2 Dpirilo	5. -----	5. -----
Ayuno 12 horas	Inducción 3 horas	Suplementación Después de la inducción

Tabla 3. Esquema aplicado a las células BL21pLys y células BL21pLys transformadas con los plásmidos p976, pChuA y pFrpB2

A los cultivos se les agregó 2,-2 dipirilo a una concentración final de 250 μ M y durante doce horas se incubó con las cepas a 37°C/200 rpm; al termino de este tiempo se determinó la densidad óptica, y con el fin de que tuvieran densidades semejantes se hicieron diluciones con medio luria; a los tubos designados se agregó IPTG (fermentas) a una concentración final de 1mM durante 3 horas continuó incubándose, a este tiempo se agregó Hb (Hb sigma) a los tubos numero 2 y a los tubos numero 3 se agregó Fe a una concentración final de 10mM.

Durante este proceso se tomaron lecturas, a partir de que se agregó el IPTG, para determinar la densidad óptica cada dos horas durante 60 horas que fue el tiempo total de la curva de crecimiento.

V. RESULTADOS

1. Identificar secuencias dentro del genoma de *H. pylori* que codifiquen para probables proteínas que unen Hb

Este objetivo se realizó con el fin de determinar si *H. pylori* cuenta con la información necesaria para sintetizar proteínas que pudieran adquirir hierro a partir de Hb.

Para cumplir este objetivo se realizó una investigación bibliográfica en la pagina <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> donde se buscó a bacterias en las cuales se hayan identificado proteínas que son capaces de unir Hb, se encontró que *Escherichia coli* (ChuA), *Porphyromonas gingivalis* (HmuR), *Neisseria meningitidis* (HmbR), *Yersenia pestis* (HmuR) son algunas bacterias donde se han localizado proteínas con esta función. Utilizando el mismo servidor se buscaron las secuencias de proteínas de estas bacterias, y con esta información se localizaron las secuencias nucleotídicas.

Por los antecedentes sabemos que las proteínas que son capaces de unir Hb cuentan con ciertas características, las cuales buscamos en las proteínas de las bacterias que habíamos encontrado, esto es, las proteínas cuentan con un dominio llamado caja TonB localizado en el extremo amino terminal, y un par de dominios FRAP y NPNL localizados en el extremo carboxilo terminal. Se empleo el programa <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw> para alinear estas secuencias, y al realizar la inspección localizamos estos dominios, además encontramos que las secuencias son divergentes, y los dominios no son totalmente conservados, sin embargo se ha demostrado que a pesar de estas diferencias los dominios son funcionales y tienen la capacidad de unir Hb (Liu y col; 2006, Perkins-Balding y col; 2003, Rossi y col; 2001, Torres y col; 1997) (Figura 14)

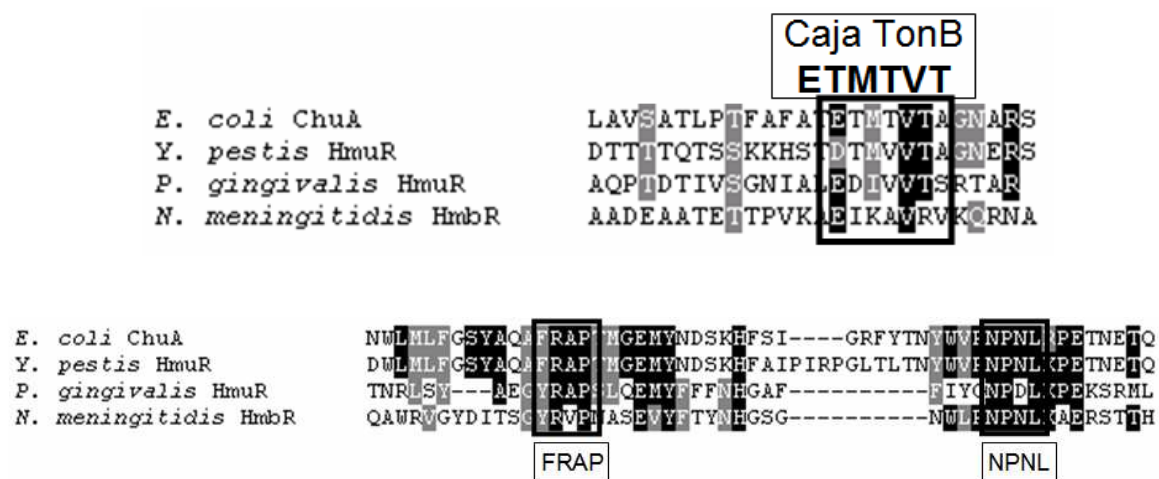


Figura 14. Alineamiento de las proteínas que unen Hb de la bacterias *E. coli* *Y. pestis*, *P. gingivalis* y *N. meningitidis*, se resalta en un rectángulo los dominios TonB box, FRAP y NPNL

Una vez que se confirmó la información cada una de las secuencias se utilizó como sonda para hacer un BLAST en la pagina <http://www.expasy.ch/tools/blast> contra el proteoma de *H. pylori* con el fin de localizar probables secuencias que unen Hb. Se localizó a tres proteínas que están clasificadas como: *Proteínas de membrana externa reguladas por hierro (hipotéticas)*, llamadas *FrpB1*, *FrpB2* y *FrpB3*.

Cabe mencionar que las imágenes y resultados a partir de este momento son solamente de nuestro control positivo, *E. coli* ChuA, y nuestra proteínas de interés FrpB2 de *H. pylori*.

La secuencia encontrada en el proteoma de *H. pylori* presenta secuencias de aminoácidos similares a los dominios caja TonB, FRAP y NPNL de las secuencias utilizadas como sonda, y también se observa que fuera de estos dominios las secuencias son totalmente divergentes (figura 15).

Con las secuencias obtenidas de las proteínas de *Escherichia coli* (ChuA), *Porphyromonas gingivalis* (HmuR), *Neisseria meningitidis* (HmbR), *Yersenia pestis* (HmuR) y *H. pylori* (FrpB2), se procedió a realizar un modelaje en el servidor (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels>)

El arreglo de aminoácidos en el espacio es en forma de barril en las cinco proteínas, lo cual nos da un indicio de que la proteína de *H. pylori* FrpB2 podría también tratarse de una proteína que sea capaz de unir Hb (figura 16).

Nuestro siguiente paso fue visualizar la estructura tridimensional de ambas proteínas utilizando el programa PyMol, esto con el fin de localizar los dominios FRAP y NPNL dentro de ambas estructuras.

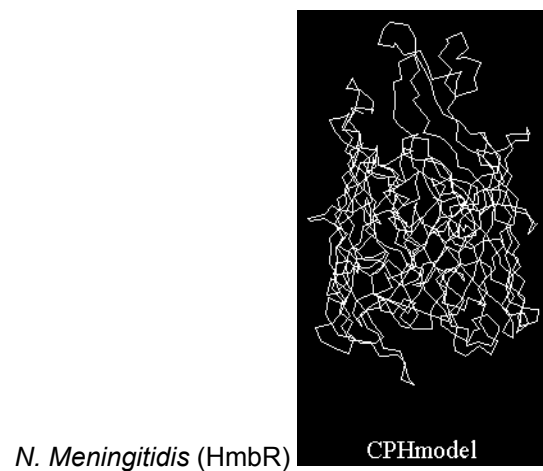
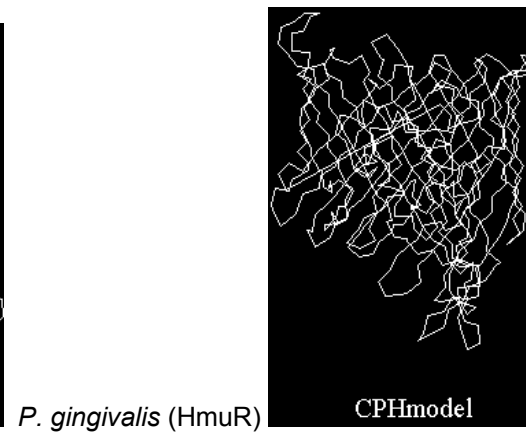
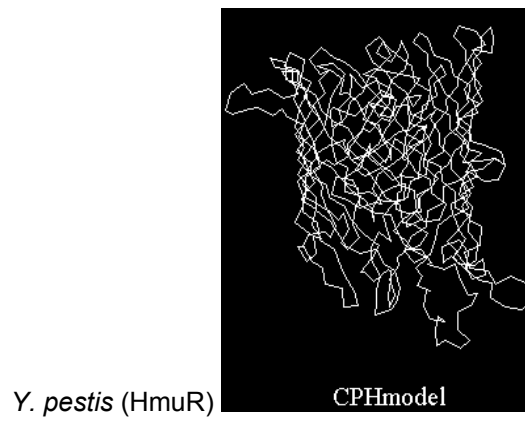
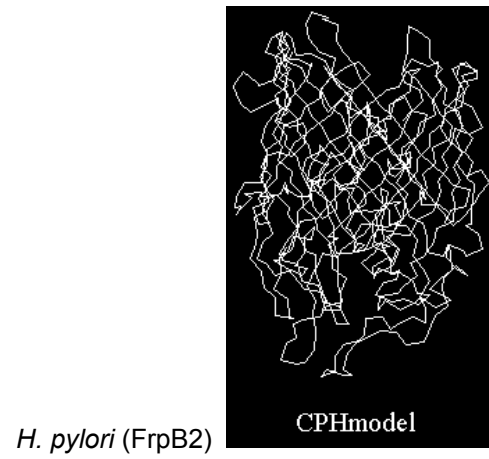
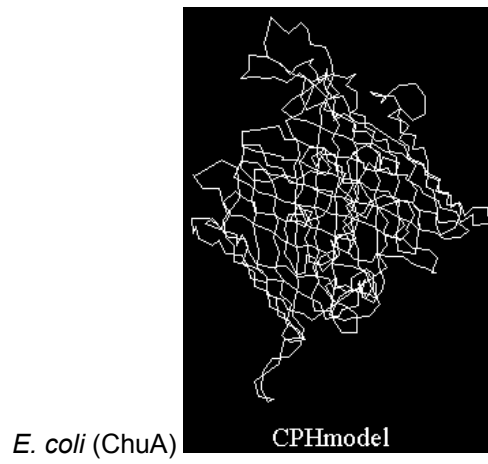
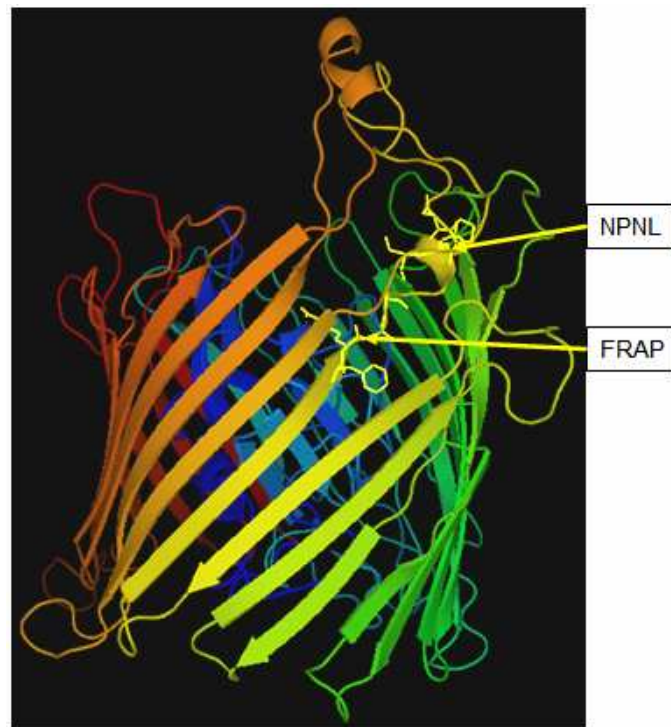


Figura 16. Modelaje tridimensional de las proteínas que unen Hb y de FrpB2 de *H. pylori*

Se puede apreciar en el modelo de *E. coli* ChuA y *H. pylori* FrpB2, que ambas tienen una forma conocida como barril y que dentro de esta estructura, se localiza una estructura llamada “plug” que funciona como un tapón (Burkhard y col; 2007). También se observan los dos dominios, FRAP y NPFL de ChuA y TRGP y NRNL de FrpB2, ambos se localizan en la parte periférica de la proteína de la proteína, esto nos demuestra que ambas proteínas comparten los dominios que son importantes para la unión de Hb, una estructura en el espacio similar lo que nos da un indicio de que la secuencia encontrada es probablemente una proteína que es capaz de unir Hb (figura 17).

E. coli ChuA



H. pylori FrpB2

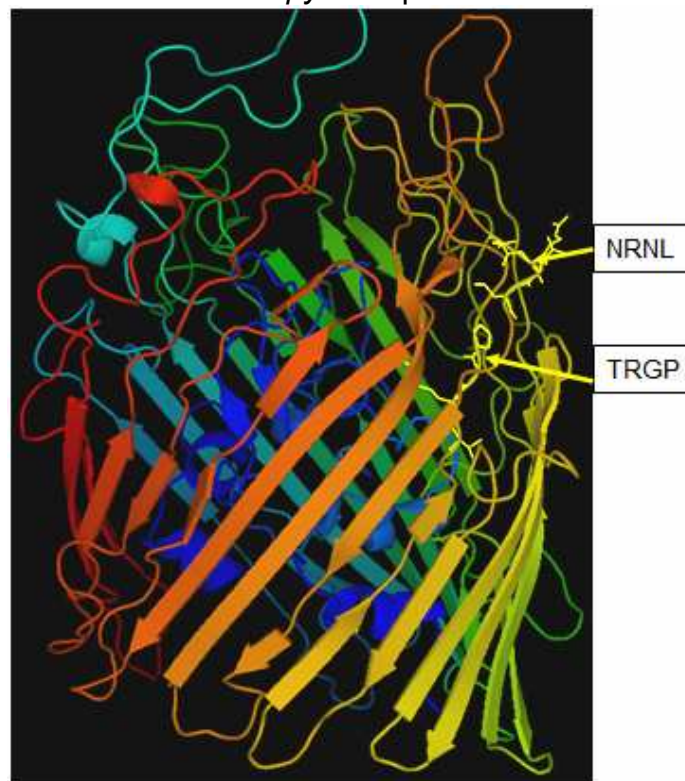


Figura 17. Modelo tridimensional de las proteínas de *E. coli* ChuA se indican los dominios FRAP y NPNL y *H. pylori* FrpB2 se indican los dominios TRGP y NRNL

2. Analizar la capacidad de unión de Hb humana por parte de la proteína FrpB2.

Para determinar si la proteína FrpB2 de *H. pylori*, es capaz de unir Hb humana se realizaron las siguientes pruebas. La proteína ChuA de *E. coli* se utilizó como control.

2.1 Obtención de DNA genómico de *E. coli* EC EH O157:H7 y de *H. pylori* J99

Se creció *E. coli* EC EH O157:H7 y *H. pylori* J99, bajo las condiciones mencionadas en materiales y métodos. El DNA total se obtuvo de cada una de ellas (figura 18)

El DNA total se utilizó como templado para la amplificación, por PCR, de los genes que fueron localizados en el análisis *in silico* (figura 19), se emplearon los oligos diseñados basados en el análisis *in silico* (tabla 3)

Bacteria	Gen	Gen ID	Oligos
<i>E. coli</i>	<i>chuA</i>	915763	Sentido 5` GGGGG <u>GAGCTC</u> ATG TCA CGT CCG CAA TTT ACC TCG TTG CGT TTG AGT TT 3`
			Antisentido 5` GGGGG <u>GAATTC</u> TTA CCA TTG ATA ACT CAC GAA AAT TTT TCC GTT ACG ACC ATC 3`
Bacteria	Gen	Gen ID	Oligos
<i>H. pylori</i>	<i>frpB2</i>	889947	Sentido 5` GGGGG <u>GAGCTC</u> ATG AAT GAC AAG CGT 3`
			Antisentido 5` GGGGG <u>TCTAGA</u> TTA AAA CTT ATA AGA AAT TTC AAA CCT AGC GTT AAA GCC AGG CTC TGC 3`

Tabla 4. Secuencias de los oligos empleados para la amplificación de los genes

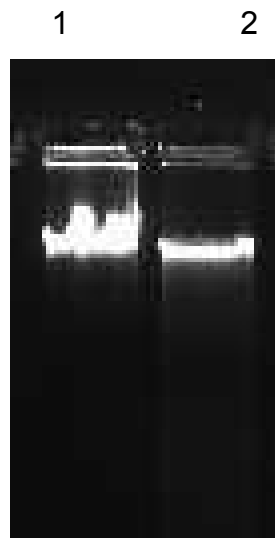


Figura 18. DNA genómico sobre gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio
Carril 1. DNA genómico de *E. coli* EC EH O157:H7
Carril 2. DNA genómico de *H. pylori* J99

2.2 Productos de PCR

Los amplicones del gen *chuA* de *E. coli* tuvieron el tamaño esperado de 2005 pb, panel A carril 2. Por otro lado el amplificado del gen *frpB2* obtenido de *H. pylori* tiene el tamaño esperado que es de 2470 pb, panel B carril 2. Con este resultado se demuestra que los oligos diseñados a partir del análisis *in silico* realmente con ellos estamos obteniendo los amplificados esperados, y además de que los oligos, son específicos al no encontrar en ningún caso otros productos amplificados en la PCR (figura 19).

Los productos de PCR se clonaron en el vector de expresión pJET1.2 Blunt (Fermentas). Además de estos dos amplicones se clonó un control que consiste en una secuencia de 976 pares de bases, que no codifica para una proteína y este vector se considera como el vector “vacío” que fue usado como control negativo.

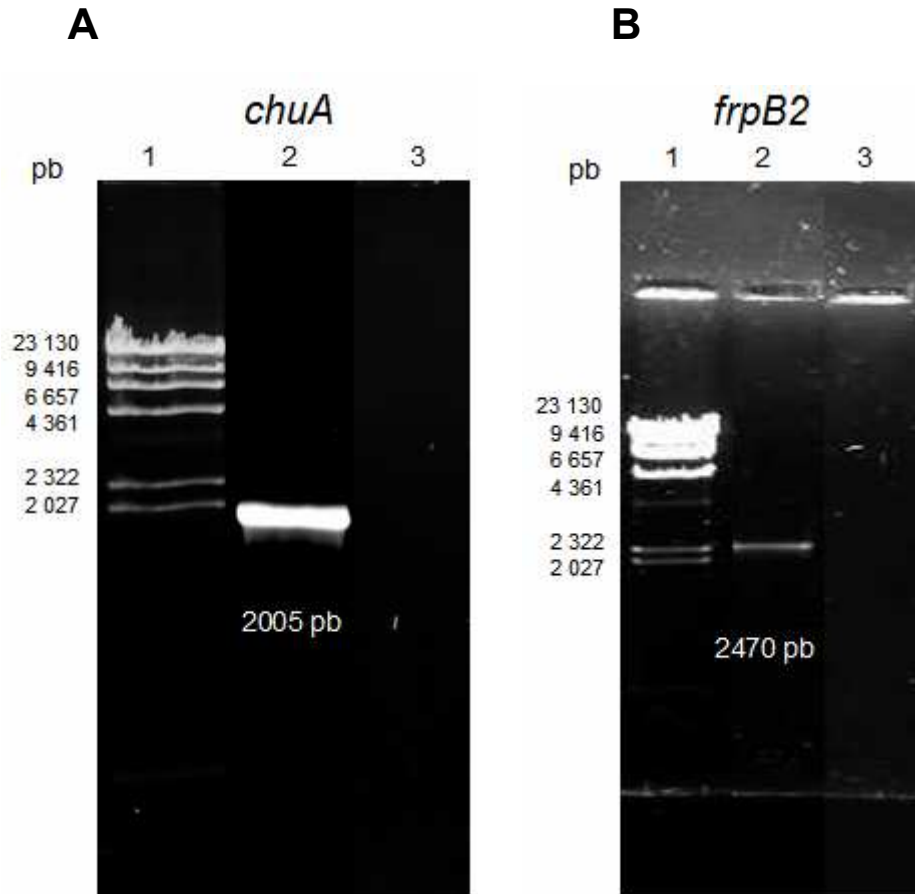


Figura 19. Amplificación por PCR de los genes *chuA* de *E. coli* EC EH O157:H7 y *frpB2* de *H. pylori*.

Panel A. Carril 1 marcador λ Hind III, carril 2 amplificado del gen *chuA* de *E. coli* de 2005 pares de bases, carril 3 control negativo

Panel B. Carril 1 marcador λ Hind III, carril 2 amplificado del gen *frpB2* de *H. pylori* de 2005 pares de bases, carril 3 control negativo

pb. Pares de bases

2.3 Selección de clonas candidatas

Los productos clonados fueron utilizados para transformar células DH5 α competentes, se crecieron en medio luria, se seleccionaron algunas colonias y se les extrajo el plásmido, esto fue visualizado sobre un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Clonas candidatas del plásmido ChuA (figura 20, panel A), en los carriles 1, 2 y 3 se muestran clonas sin inserto, en el carril 4 se puede apreciar un plásmido con dos isoformas al cual se le aplicaron otras pruebas para determinar si contenía el inserto del gen *chuA*. En el panel B de la figura 20 se corrieron los candidatos FrpB2, el carril 1 se muestra al plásmido pChuA que sirvió de referencia para ver la migración de los candidatos, en los carriles 2, 3, 5, y 6 se observan solamente al vector vacío, el carril 4 muestra a un candidato con inserto porque se puede apreciar una migración semejante al plásmido pChuA, de igual manera a este candidato se le aplicaron mas pruebas para determinar si realmente se trata del gen *frpB2* clonado. En el panel C de la figura 20, se muestra al control 976, el carril 1 y 2 muestran vectores vacíos, el carril 3 observamos un plásmido con dos isoformas al cual también se aplicaron otras pruebas para confirmar la inserción del nucleótido de 976 pares de bases.

Esta información nos dice que el vector a pesar de ser de selección positiva (véase materiales y métodos), puede dar lugar a clonas que no contienen el inserto que en primera instancia se ha decidido clonar. Por otro lado con ayuda de referentes podemos ver, como en el caso de la clona FrpB2, que se llevó a cabo una clonación exitosa.

El plásmido obtenido al insertar el gen *chuA* en el vector pJET se llama pChuA

El plásmido obtenido al insertar el gen *frpB2* en el vector pJET se llama pFrpB2

El plásmido obtenido al insertar los 976 pb en el vector pJET se llama p976

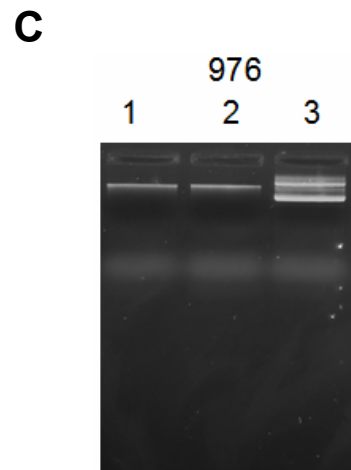
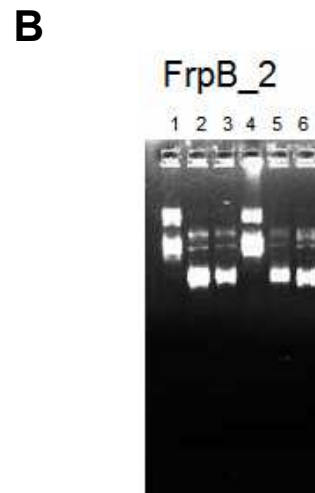
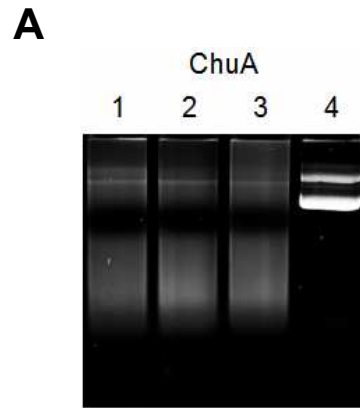


Figura 20. Clonas candidatas.

Panel A, candidatos de ChuA, carriles 1, 2 y 3 vector vacío, carril 4 candidato en el cual se aprecian dos isoformas del plásmido ChuA.

Panel B, candidatos FrpB2, carril 1 plásmido pChuA, carriles 2, 3, 5 y 6 vector vacío, carril 4 candidatos en el cual se aprecian dos isoformas del plásmido pFrpB2

Panel C, candidatos del control 976, carril 1 y 2 vector vacío, carril 3 candidato en el cual se aprecian dos isoformas del plásmido 976

2.4 confirmación del inserto por PCR.

Esta prueba se realizó empleando al plásmido como templado, con el fin de determinar si el fragmento clonado, es amplificado por los oligos diseñados. Esta prueba es para confirmar que la clonación realmente se realizó con el gen seleccionado.

Los amplificados de PCR a partir de DNA de *E. coli* EC EH O157:H7 y del plásmido pChuA se muestran en la figura 21 panel A. en el panel B de la figura 21 se muestran los amplificados de PCR a partir de DNA de *H. pylori* y del plásmido pFrpB2.

En ambos casos se demuestra que los amplificados corresponden, por tamaño, a los genes seleccionados por el análisis *in silico* (figura 21)

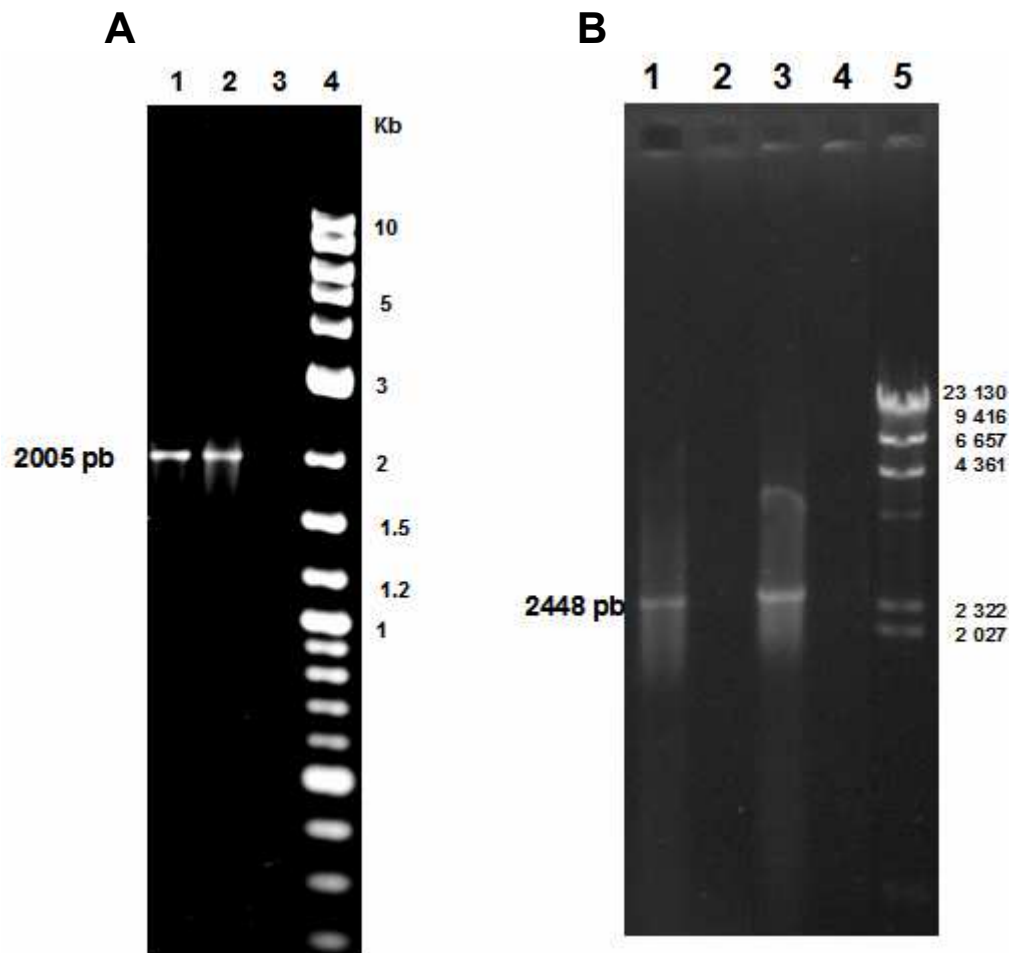


Figura 21. Productos de PCR empleando los plásmidos como templado.

Panel A. carril 1 producto de PCR empleando como templado DNA total de *E. coli* EC EH O157:H7, carril 2 producto de PCR empleando como templado el plásmido pChuA, carril 3 control negativo, carril 4 marcador de 1kb. Producto de PCR 2005 pb.

Panel B. carril 1 producto de PCR empleando como templado DNA total de *H. pylori*, carril 2 control negativo, carril 3 producto de PCR empleando como templado el plásmido pFrpB2, carril 4 control negativo, carril 5 marcador λ Hind III. Producto de PCR 2448 pb.

Geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

2.5 Caracterización con enzimas de restricción de los plásmidos pChuA, pFrpB2 y p976

Los candidatos fueron nombrados como pChuA de *E. coli*, pFrpB2 de *H. pylori* y p976 el control.

Los plásmidos se sometieron a restricción con enzimas, esto fue realizado para analizar si, el inserto, se encontraba en marco de lectura con respecto al sitio promotor.

2.5.1 Caracterización del plásmido pChuA

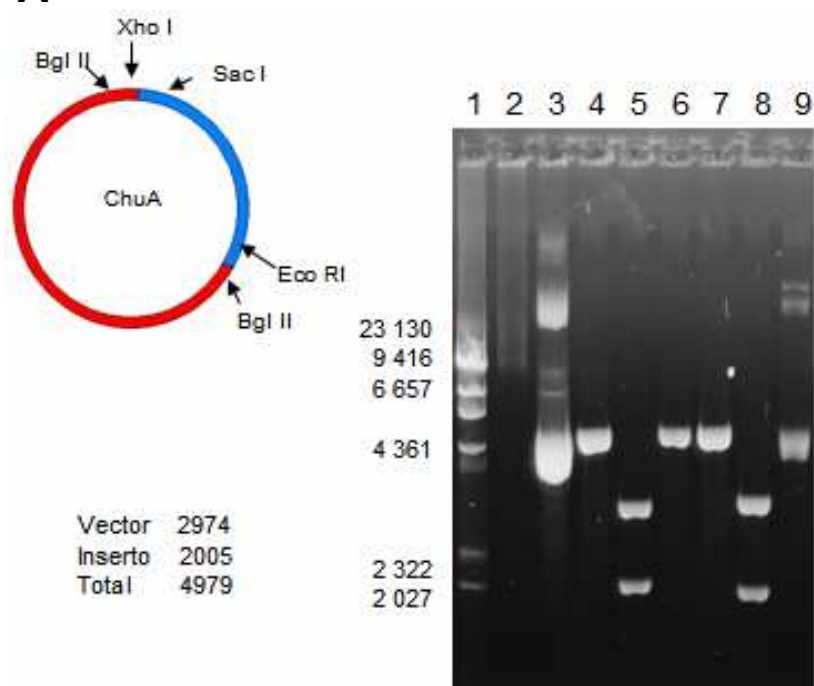
El gen clonado *chuA* tiene un tamaño de 2005 pb, al ser amplificado por la PCR se agregó un sitio de restricción para la enzima Sac I, extremo 5', y otro para Eco RI, extremo 3'; el vector (pJET1.2Blunt) tiene sitios de corte para las enzimas Bgl II y Xho I. El vector tiene un tamaño de 2974 pb mas el gen *chuA* de 2005 pb da un total de 4979 pb.

En el panel A de la figura 22 se esquematiza el plásmido pChuA en el que se muestran los sitios de restricción empleados en esta caracterización. Las digestiones con las enzimas Xho I carril 4, Sac I carril 6 y Eco RI carril 7 muestran que el plásmido solo posee un sitio de corte para cada enzima, por lo que en estos casos se consigue la linearización del plásmido pChuA, lo que nos permite comprobar que presenta el tamaño esperado de 4976 pb. La enzima Bgl II tiene dos sitios de corte los cuales flanquean al inserto clonado por lo que al digerir con esta enzima obtenemos su liberación con lo cual también se demuestra que su tamaño es de 2005 pb, la otra banda que se observa es el resto del vector con un tamaño aproximado de 2974 pb. Finalmente se puede apreciar en el carril 8 que al hacer una doble digestión con las enzimas Sac I y Eco RI, que son los sitios agregados en la PCR, también se obtiene un producto de 2005 pb que corresponde al gen *chuA* que fue clonado, una banda mas pesada se observa y corresponde al resto del vector con un tamaño aproximado de 2974 pb

En el panel B de la figura 22 se muestra el resultado del experimento diseñado para determinar la orientación del inserto. Se muestra el esquema del inserto linearizado, señalando un sitio de corte para la enzima Kpn I, aproximadamente en la base numero 1745, y nuevamente el plásmido con los sitios de restricción de las enzimas empleadas para esta prueba. La enzima Xho I carril 1, y la enzima Kpn I carril 2 solo tienen un sitio de corte por lo que el resultado es la linearización del plásmido pChuA. El sitio de corte para Xho I se encuentra corriente abajo del sitio promotor T7, por lo que al digerir con la enzima Kpn I y Xho I se obtiene un producto de aproximadamente 1745 pb como se puede apreciar en el carril 3, una banda de aproximadamente 3234 pb corresponde al resto del vector

Los resultados obtenidos sugieren que el inserto clonado en el vector pJET1.2Blunt corresponde al gen *chua* de *E. coli*, esto por el tamaño que se observa al efectuar una doble digestión y que este mismo ha sido clonado en sentido, de lo contrario el producto obtenido seria de solo 250 pb.

A



B

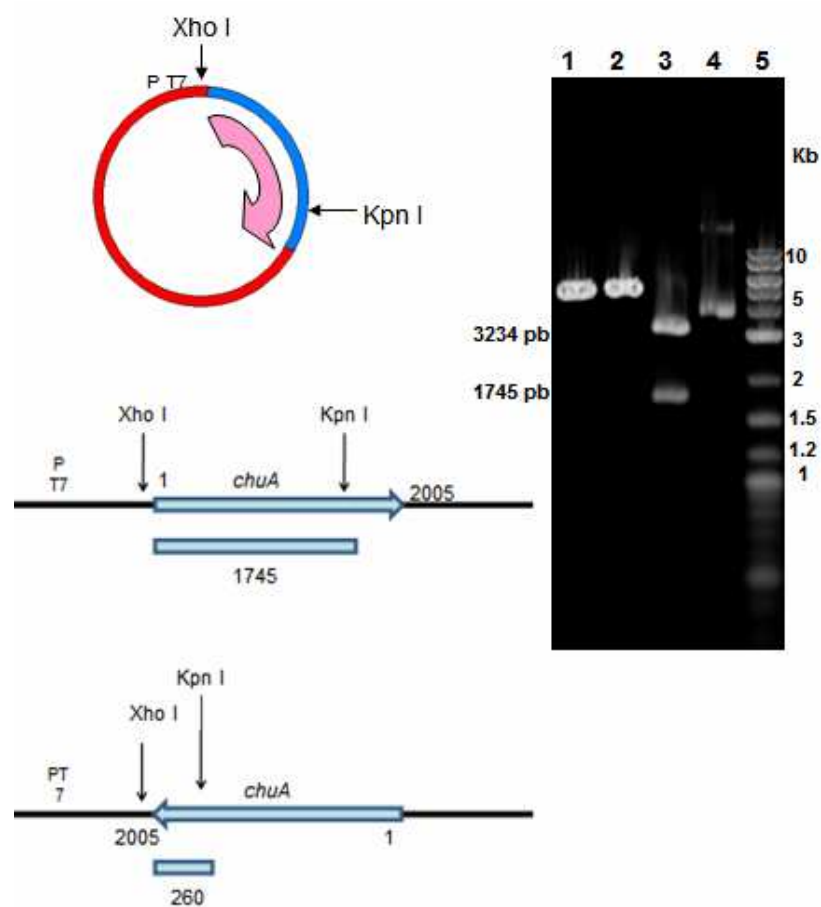


Figura 22. Caracterización con enzimas de restricción del plásmido pChuA.

Panel A. Esquema del plásmido pChuA en donde se muestran los sitios de restricción para las enzimas Bgl II, Xho I, Sac I y Eco RI.. Carril 1 marcador λ Hind III, carril 2 DNA genómico de *E. coli* EC EH, carril 3 pChuA sin tratamiento, carril 4 digestión con la enzima Xho I, carril 5 digestión con la enzima Bgl II, carril 6 digestión con la enzima Sac I, carril 7 digestión con la enzima Eco RI, carril 8 doble digestión con las enzimas Sac I y Eco RI, carril 9 control negativo.

Panel B. Esquema de los sitios de corte para las enzimas Xho I y Kpn I, empleadas para determinar el sentido del inserto. Carril 1 digestión con la enzima Xho I, carril 2 digestión con la enzima Kpn I, carril 3 doble digestión con las enzimas Xho I y Kpn I, carril 4 control negativo, carril 5 marcador de 1 kb.

Geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio

2.5.2 Caracterización de plásmido pFrpB2

La caracterización con enzimas de restricción del plásmido pFrpB2, el gen *frpB2* tiene un tamaño de 2448 pb y por amplificación por PCR se agregaron dos sitios de restricción uno en el extremo 5' Sac I y otro al extremo 3' Xba I, el plásmido pFrpB2 tiene un tamaño de 5422 pb.

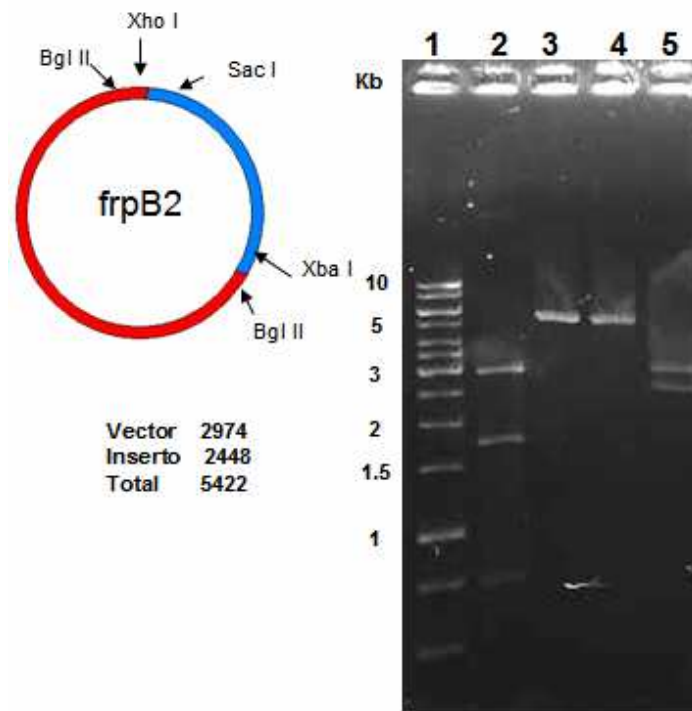
En el panel A de la figura 23 se esquematiza al plásmido pFrpB2 y las enzimas que se utilizaron para esta caracterización. Al digerir con las enzimas Sac I carril 3 y Xba I carril 4 estas solo reconocen un sitio de corte dentro del plásmido por lo que el resultado es la linearización del plásmido y comprobamos que su tamaño es de 5422 pb, que es el tamaño esperado. Cuando se digiere al plásmido con la enzima Bgl II, sus cortes flanquean al inserto por lo que lo liberan, carril 2, en este caso apreciamos que la enzima corta en tres sitios dando un fragmento de aproximadamente 2974 pb que corresponde al vector, por lo que la enzima esta reconociendo un sitio dentro del inserto, por ello se ve una banda de 750 y 1700 pb aproximadamente. En el carril 5 se observa el resultado de la doble digestión con las enzimas Sac I y Xba I y se aprecian dos bandas una de 2974 pb que corresponde al vector y una de 2448 pb que corresponde al inserto, con ello comprobamos que se insertó corresponde en tamaño al gen *frpB2* de *H. pylori*.

En el panel B de la figura 23 se esquematiza el gen *frpB2* linearizado, señalando el sitio de corte para la enzima Xma I y también se esquematiza el plásmido pFrpB2 señalando los sitios de corte para las enzimas que se emplearon para determinar el sentido del inserto. La enzima Xho I carril 1 y Xma I carril 2 solo reconocen un sitio de corte dentro del plásmido por lo que el resultado es la linearización del mismo y se aprecia una banda de 5422 pb aproximadamente. Al realizar la doble digestión con las enzimas Xho I y Xma I vemos la liberación de un fragmento de aproximadamente 2203 pb y otra banda de aproximadamente 3219 pb. Con este resultado se demuestra que el inserto esta en sentido con respecto al

sitio promotor T7, por que de lo contrario la doble restricción habría liberado un fragmento de aproximadamente 240 pb.

Con estos resultados comprobamos que el inserto corresponde, en tamaño, al gen *frpB2* de *H. pylori* y que se encuentra en sentido.

A



B

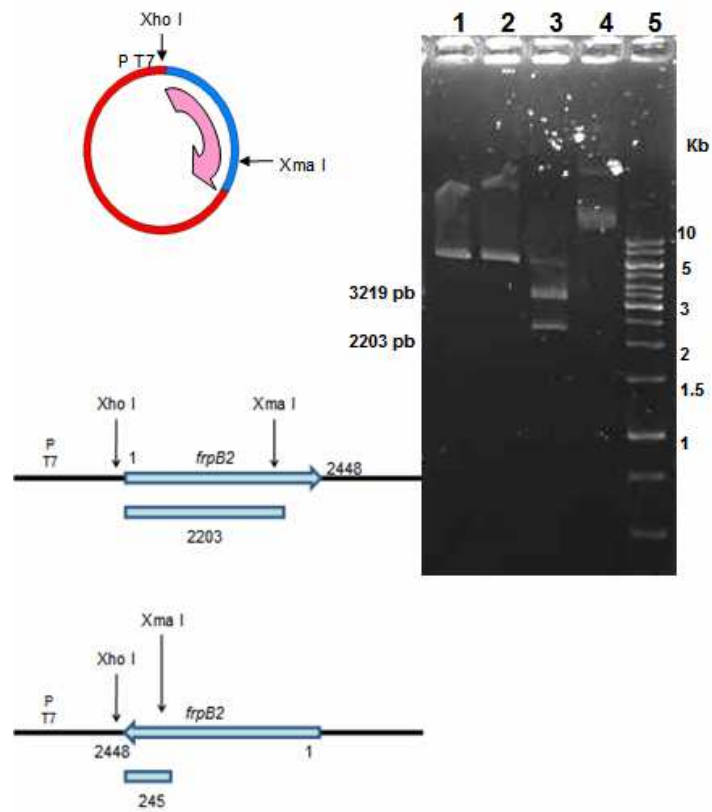


Figura 23. Caracterización con enzimas de restricción del plásmido pFrpB2

Panel A. Esquema del plásmido pFrpB2 en donde se muestran los sitios de restricción para las enzimas empleadas en esta caracterización. Carril 1 marcador de pares de bases de 1 kb, carril 2 digestión con la enzima Bgl II, carril 3 digestión con la enzima Sac I, carril 4 digestión con la enzima Xba I, carril 5 doble digestión con las enzimas Sac I y Xba I.

Panel B. Esquema de los sitios de corte para las enzimas empleadas para determinar el sentido del inserto. Carril 1 digestión con la enzima Xho I, carril 2 digestión con la enzima Xma I, carril 3 doble digestión con las enzimas Xho I y Xma I, carril 4 control negativo, carril 5 marcador de 1 kb.

Geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio

2.5.3 Caracterización de plásmido p976

El plásmido p976 fue caracterizado con enzimas de restricción, este plásmido es el control negativo (véase materiales y métodos).

Se esquematiza en la figura 24 el plásmido y los sitios de corte utilizados en la caracterización. En el carril 3 se muestra la digestión con la enzima Xho I, la cual solo tiene un sitio de corte, se observa una banda de 3950 pb que corresponde al plásmido linearizado. Carril 4 se muestra la digestión con la enzima Bgl II la cual flanquea al inserto permitiendo su liberación, por ello se observan dos fragmentos, uno de 2974 pb que es el vector y otra de 976 pb que es el inserto, el carril 5 muestra el control negativo.

Con este resultado se muestra que el control negativo fue clonado correctamente y por consiguiente puede ser utilizado para las siguientes pruebas.

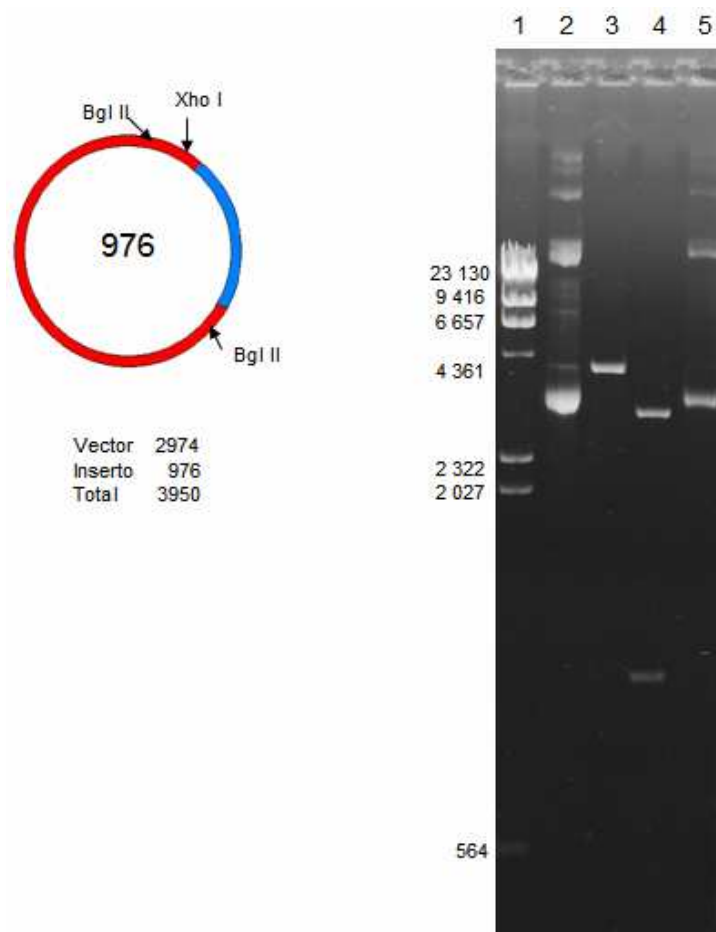


Figura 24. Caracterización con enzimas de restricción del plásmido p976. Esquema del plásmido p976 en el que se muestran los sitios de restricción para las enzimas Bgl II y Xho I. Carril 1 marcador λ Hind III. carril 2 plásmido sin tratamiento, carril 3 digestión con la enzima Xho I, carril 4 digestión con la enzima Bgl II, carril 5 control negativo. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio

2.6 Secuenciación de los plásmidos pChuA y pFrpB2

Esta prueba se realizó con el fin de demostrar que los genes clonados en el vector pJET 1.2Blunt, corresponden al gen *chuA* de *E. coli* EC EH O157:H7 y al gen *frpB2* de *H. pylori*. Además para demostrar que los genes amplificados por PCR, codifican para proteínas que poseen los dominios FRAP y NPNL para *E. coli* y TRGP y NRNL para *H. pylori*, los cuales son importantes para la unión de Hb, en el caso de *E. coli* y se cree que son importantes para *H. pylori*.

Los datos obtenidos en la secuenciación fueron comparados con los obtenidos en la base de datos (NCBI), se alinearon y fueron traducidos a proteínas (ExPASy) y se localizaron los dominios.

2.6.1 Secuenciación del plásmido pChuA

El alineamiento efectuado con CLUSTALW se muestra en la figura 25 panel A, Se muestra la secuenciación del plásmido pChuA (CHUAF) y la comparación con la secuencia del gen *chuA* (Q7DB97) (Gen ID 915763) obtenida de la base de datos (NCBI).

La secuencia obtenida del inserto *chuA* fue traducida y se obtuvo la secuencia de aminoácidos (ExPASy), con esta información se realizó un BLAST contra el proteoma de *E. coli* EC EH O157:H7, en el panel B de la figura 25, se muestra el resultado del BLAST, y se tiene un 99% de identidades. Se destaca en un cuadro los dominios FRAP y NPNL y vemos que el inserto *chuA* codifica para una proteína que conserva ambos dominios, los cuales son importantes para la unión de la Hb.

La secuenciación muestra que dentro del plásmido pChuA, está clonado el gen *chuA*, y que además al momento de la sobreexpresión de la proteína, esta se sintetizara con los dominios importantes para la unión de la Hb.

A

```

CHUAF          GAAACTTCGGGAGGGTTCGAGTTTTTCAGCAAGATGGGGGAGCTCATGTCACGTCCGC 60
Q7DB97|Q7DB97_EC057 -----ATGTCACGTCCGC 13
                        *****

CHUAF          AATTTACCTCGTTGCCTTTGAGTTTATTGGCCTTAGCTGTTTCTGCCACCTTGCCAAACGT 120
Q7DB97|Q7DB97_EC057 AATTTACCTCGTTGCCTTTGAGTTTATTGGCCTTAGCTGTTTCTGCCACCTTGCCAAACGT 73
                        *****

CHUAF          TTGCTTTTGCTACTGAAACCATGACCGTTACGGCAACGGGGAATGCCCGTAGTTCCTTCG 180
Q7DB97|Q7DB97_EC057 TTGCTTTTGCTACTGAAACCATGACCGTTACGGCAACGGGGAATGCCCGTAGTTCCTTCG 133
                        *****

```

B

```

tr Q7DB97      SubName: Full=Outer membrane heme/hemoglobin receptor (Heme 660 AA
Q7DB97_EC057  utilization/transport protein); [Name=chuA;] align
               [Escherichia coli O157:H7]

Score = 527 bits (1357), Expect = e-151
Identities = 251/252 (99%), Positives = 251/252 (99%)

Query: 1  KWSSRAGMTINPTNULMLFGSYAQAFRAPTMGEMYNDSKHFSIGRFYTNYWVNPNLRPE 60
          KWSSRAGMTINPTNULMLFGSYAQAFRAPTMGEMYNDSKHFSIGRFYTNYWVNPNLRPE
Sbjct: 409 KWSSRAGMTINPTNULMLFGSYAQAFRAPTMGEMYNDSKHFSIGRFYTNYWVNPNLRPE 468

```

Figura 25. Secuenciación y traducción del gen *chuA* clonado en el plásmido pChuA. Panel A muestra la comparación entre el gen *chuA* clonado en el plásmido pChuA (CHUAF) y el gen *chuA* (Q7DB97) (Gen ID 915763). Panel B muestra el resultado de la traducción de nucleótidos y el BLAST contra el proteoma de *E. coli* EC EH O157:H7, se enmarcan los dominios FRAP y NPNL.

2.6.2 Secuenciación del plásmido pFrpB2

La secuenciación del gen *frpb2* clonado en el plásmido pFrpB2 se muestra en la figura 26. En el panel A se han alineado la secuencia obtenida del gen *fprB2* clonado en pFrpB2 (FRPB2F) y la secuencia del gen *frpB2* de *H. pylori* (Q9ZKT4) (Gen ID 890041) obtenida de la base de datos (NCBI)

En el panel B de la figura 26 se ve el resultado de la traducción de la secuencia de nucleótidos del plásmido pFrpB2 y la secuencia con la que se compara al realizar el BLAST, se tiene una identidad del 96 %. Se observa que los dominios que consideramos son los que pueden unir Hb están presentes, por un lado el TRGP y el NRNL tiene un cambio en el ultimo aminoácido, cambiando la L por una F.

Con este resultado se muestra que el gen clonado en el vector pJET1.2Blunt, corresponde al gen *frpB2* de *H. pylori*, y que este al ser sobreexpresado dará lugar a la proteína que poseerá los dominios que consideramos serán importantes para la unión de la Hb.

A

```
FRPB2F          CAACTCTGGGAGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGGGGGAGCTCATGAATGACAAGCG 60
Q9ZKT4|Q9ZKT4_HELPJ -----ATGAATGACAAGCG 14
                      *****

FRPB2F          TTTTAGAAAAATTGCAAGTTTTCTATTTTTTGTCTTATTAGGAACGTTTGAATTAGA 120
Q9ZKT4|Q9ZKT4_HELPJ TTTTAGAAAAATTGTAGTTTTCTATTTTTTGTCTTATTAGGAACGTTTGAATTAGA 74
                      *****
```

B

```
tr Q9ZKT4      SubName: Full=Putative IRON-REGULATED OUTER MEMBRANE PROTEIN; 815 AA
Q9ZKT4_HELPJ  [Name=frpB_2:] [Helicobacter pylori J99 (Campylobacter
pylori J99)]

Score = 457 bits (1176), Expect = e-130
Identities = 222/227 (97%), Positives = 224/227 (98%)

Query: 6  YAYVTRGPNIPGGLVWMRQDNLRNLRNFK 33
          YAYVTRGPNIPGGLVWMRQDNLRNLRN  K
Sbjct: 558 YAYVTRGPNIPGGLVWMRQDNLRNLRNLK 585
```

Figura 26. Secuenciación y traducción del gen *frpB2* clonado en el plásmido pFrpB2. Panel A muestra la comparación entre el gen *frpB2* clonado en el plásmido pFrpB2 (FRPB2F) y la secuencia del gen *frpB2* de *H. pylori* (Q9ZKT4) (Gen ID 890041). Panel B muestra el resultado de la traducción de nucleótidos y el BLAST contra el proteoma de *H. pylori*, se enmarcan los dominios TRGP y NPNL.

Una vez que se ha confirmado que se cuenta con los plásmidos y que estos expresaran la proteína de interés y esta proteína tendrá los dominios que participan en la unión de Hb, se procede a demostrar la unión de Hb por parte de la proteína FrpB2 de *H. pylori*, se realiza la prueba *in vitro* overlay. La proteína ChuA de *E. coli* es el control positivo, porque en esta proteína ya se ha demostrado su capacidad de unir Hb.

2.7 Overlay de la fracción soluble

Los antecedentes mencionan que las proteínas que tienen la habilidad de unir Hb son proteínas que se encuentran en la membrana (Liu X y Col 2006, Perkins-Balding D y Col 2003, Rossi MS y Col 2001, Torres A G y Payne S M 1997).

En el Coomassie, figura 27 panel A, se observan diferentes proteínas de la fracción soluble, pero en ningún caso hay una sobreexpresión a nivel de las proteínas que se esperan. La proteína de *E. coli* (ChuA) que se sobreexpresa tiene un peso molecular de 69.0 kDa y a este nivel no se ve una mayor expresión. La proteína de *H. pylori*, FrpB2, tiene un peso molecular de 90.8 kDa y sobre el gel no se observa una sobreexpresión a este nivel. El control negativo no sobreexpresa ninguna proteína.

En el panel B de la figura 27 se muestra el resultado del overlay, en todos los casos no existe señal lo cual nos indica que ninguna de las proteínas de la fracción soluble es capaz de unir Hb.

Este resultado nos muestra que la proteína ChuA de *E. coli* y FrpB2 de *H. pylori*, que han sido sobreexpresadas, no se localizan en la fracción soluble de las células y que no hay alguna proteína de esta fracción que se capaz de unir Hb.

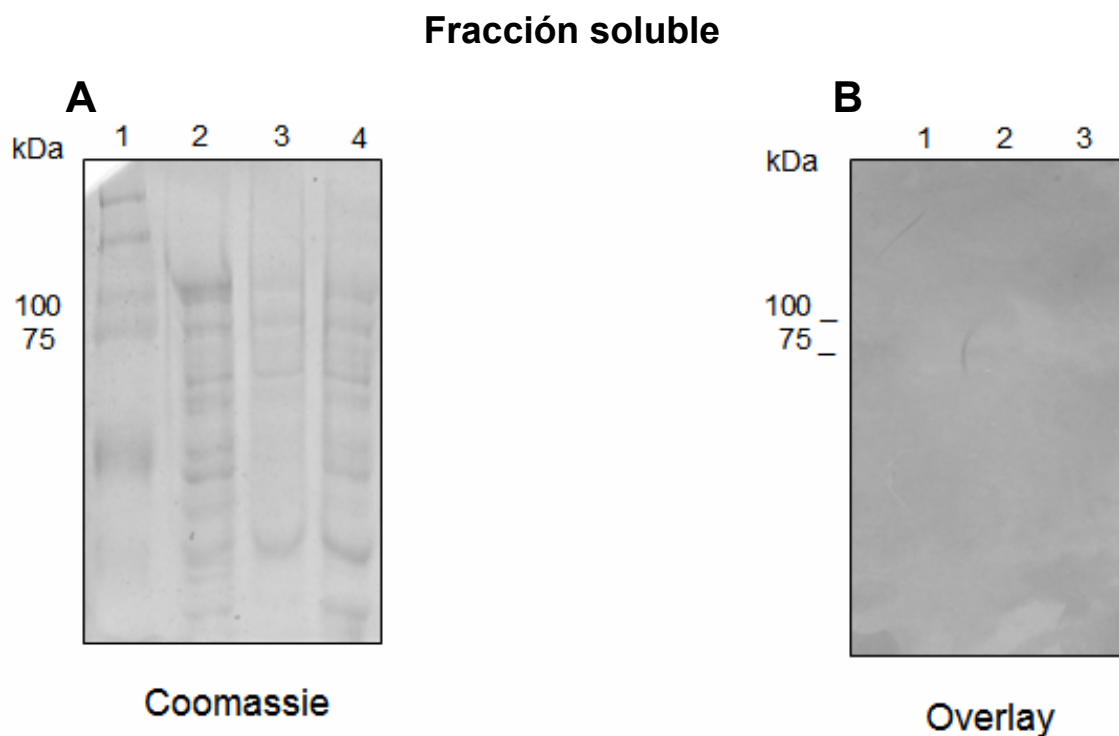


Figura 27. Coomassie y Overlay de la fracción soluble de células BL21PLys transformadas con el plásmido pChuA, pFrpB2 y p976.

Panel A. Coomassie de la fracción soluble, Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 proteínas solubles de células BL21pLys transformadas con el plásmido p976. Carril 3 proteínas solubles de células BL21pLys transformadas con el plásmido pChuA. Carril 4 proteínas solubles de células BL21pLys transformadas con el plásmido pFrpB2. Gel de agarosa al 12% y teñido con Coomassie.

Panel B. Overlay de la fracción soluble. Carril 1 overlay de proteínas solubles de células BL21pLys transformadas con el plásmido p976. Carril 2 overlay de proteínas solubles de células BL21pLys transformadas con el plásmido pChuA. Carril 3 overlay de proteínas solubles de células BL21pLys transformadas con el plásmido pFrpB2.

2.8 Overlay de la fracción membranal

Los datos obtenidos de la bibliografía y el análisis *in silico* indican que tanto la proteína de *E. coli* ChuA y de *H. pylori* FrpB2 son de membrana, por otra parte ha sido demostrado que ChuA une Hb (Torres y col; 1997). Con estos antecedentes nosotros nos propusimos demostrar que FrpB2 es capaz de unir Hb, para ello se realizó el overlay de la fracción membranal.

El panel A de la figura 28 muestra el Coomassie de las proteínas de membrana de las células BL21pLys transformadas con los plásmidos pChuA, pFrpB2 y p976. El carril 3 muestra una sobreexpresión de una proteína que puede ser ChuA, esto porque esta al nivel del peso esperado que es de 69.0 kDa. El carril 4 se observa sobreexpresión a nivel del peso que puede ser de la proteína FrpB2, esto es 80.9 kDa. El control negativo no sobreexpresa ninguna proteína proveniente del plásmido.

Panel B de la figura 28 muestra el resultado del overlay. Esta prueba nos muestra las proteínas que se pueden unir a Hb, en el carril 2 se observa señal a nivel de la proteína sobreexpresada en el Coomassie, esta señal demuestra que la proteína sobreexpresada es capaz de unir Hb, esta proteína es chuA. Con esta prueba se corrobora que la proteína chuA une Hb. El carril 3 muestra que la proteína sobreexpresada en el Coomassie da señal lo cual indica que es capaz de unir Hb. En el carril 1 no hay señal por lo que no hay proteína que une Hb proveniente del plásmido p976

El ensayo de overlay de la fracción membranal de las células transformadas con el plásmido pChuA y pFrpB2, muestran que la proteína sobreexpresada es capaz de unir Hb.

Fracción membranal

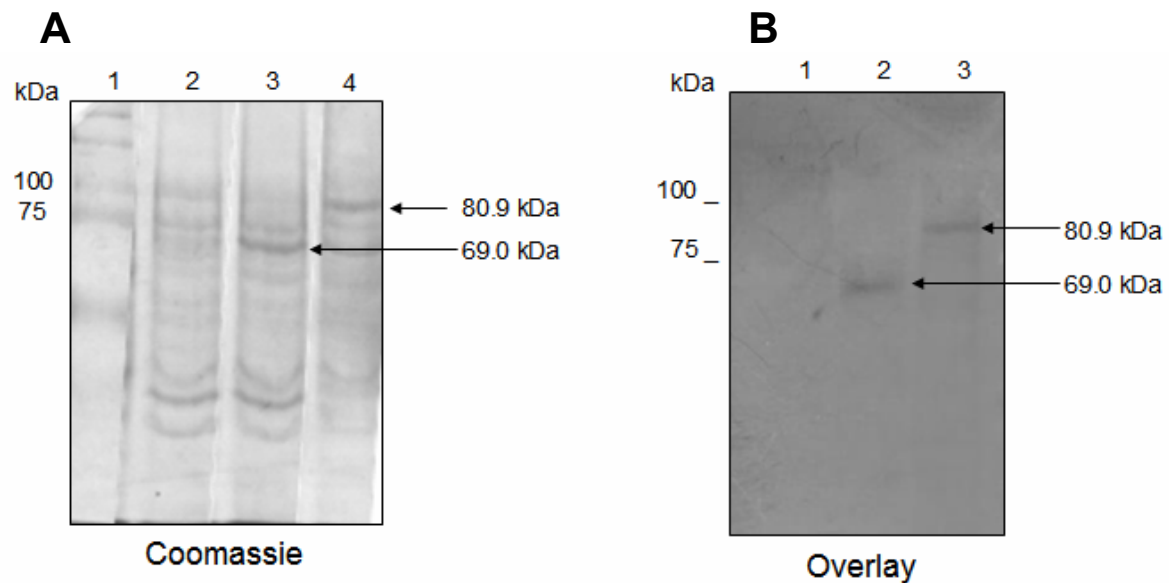


Figura 28. Coomassie y Overlay de la fracción membranal de células BL21pLys transformadas con el plásmido pChuA, pFrpB2 y p976.

Panel A. Coomassie de la fracción membranal, Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 proteínas membranales de células BL21pLys transformadas con el plásmido p976. Carril 3 proteínas membranales de células BL21pLys transformadas con el plásmido pChuA. Carril 4 proteínas membranales de células BL21pLys transformadas con el plásmido pFrpB2. Gel de agarosa al 12% y teñido con Coomassie.

Panel B. Overlay de la fracción membranal. Carril 1 overlay de proteínas membranales de células BL21pLys transformadas con el plásmido p976. Carril 2 overlay de proteínas membranales de células BL21pLys transformadas con el plásmido pChuA. Carril 3 overlay de proteínas membranales de células BL21pLys transformadas con el plásmido pFrpB2.

3. Evaluación de la función de la proteína FrpB2

Una vez que se ha demostrado la capacidad de la proteína FrpB2 de unir Hb humana en una prueba *in vitro*, ahora hace falta demostrar que la proteína sobreexpresada por el plásmido pFrpB2, es capaz de soportar el crecimiento utilizando a la Hb como única fuente de hierro en una prueba *in vivo*, esto es las curvas de crecimiento. Se empleó a la proteína sobreexpresada ChuA, la cual se ha demostrado puede soportar el crecimiento celular usando a la Hb, como control positivo y al plásmido p976 como control negativo

3.1 Prueba de funcionalidad

3.1.1 Curvas de crecimiento

Esta prueba *in vivo* se lleva a cabo para determinar si la proteína que se esta sobreexpresando es capaz de conferirle a la célula transformada, la capacidad de utilizar la Hb como única fuente de hierro y con ello permitirle su desarrollo. Para esto se probaron las células BL21pLys sin transformar como control, y las transformadas con los plásmidos pChuA, pFrpB2 y p976 (véase materiales y métodos)

Las células BL21pLys (figura 29, panel A) y las células BL21pLys que fueron transformadas con el plásmido p976 (figura 29, panel B), plásmido pChuA (figura 29, panel C) y el plásmido pFrpB2 (figura 29, panel D) se comportaron de manera similar cuando se crecen en caldo luria y suplementado con IPTG, esto es, presentan un crecimiento normal, lo cual nos sugiere que el IPTG no esta dando lugar a la sobreexpresión de alguna proteína que resulte toxica para las células.

Ante la presencia del quelante de hierro 2,-2 dipirilo, las células son incapaces de crecer lo cual nos muestra que el hierro esta siendo secuestrado y no esta de manera accesible y por lo tanto no lo pueden obtener.

Bajo la condición en la que se tiene 2,-2 dipirilo y se ha agregado IPTG vemos un comportamiento similar, esto es, no hay crecimiento bajo esta condición, lo cual nos habla de que el hierro no está disponible y que además no se está sobreexpresando una proteína que sea capaz de obtener hierro del medio y por lo tanto las células no lo obtienen y son incapaces de crecer.

Sin embargo cuando en el medio se tiene el quelante, mas el IPTG pero ahora se agrega una fuente alterna de hierro, se observa que la célula es capaz de utilizarla y nuevamente presentar crecimiento, lo cual nos sugiere que las células son viables y esto se puede observar en todos los casos.

Finalmente cuando se tiene la presencia del quelante de hierro, IPTG y se agrega Hb, se observan comportamientos diferentes. Las células BL21pLys no crecen lo cual nos sugiere que estas células no cuentan con una proteína que sea capaz de obtener hierro a partir de Hb, por lo tanto, las células son un referente que nos muestra que, si se observa un comportamiento diferente se deberá a los plásmidos insertados en esta célula. Las células transformadas con el plásmido p976 tampoco son capaces de crecer bajo esta condición, lo cual nos muestra que el plásmido no expresa alguna proteína que sea capaz de obtener hierro a partir de Hb, por lo que, si se observa un comportamiento diferente a esta célula transformada se podrá deber al gen clonado.

Las células transformadas con el plásmido pChuA sobreexpresan la proteína ChuA (que es nuestro control positivo), la cual se ha demostrado puede soportar el crecimiento celular a partir de Hb como única fuente de hierro. Se observa en la grafica de la figura 29, panel C, que cuando se ha quelado el hierro y se induce la producción de la proteína ChuA, las células presentan crecimiento lo cual nos sugiere que la célula adquirió la habilidad de obtener hierro a partir de la Hb y por lo tanto es capaz de desarrollarse.

En cuanto a la proteína de interés, FrpB2, se observa que en presencia del quelante de hierro 2,-2 dipirilo, y que fue inducida con IPTG, lo que da lugar a la sobreexpresión de la proteína FrpB2. La célula es capaz de crecer, lo cual nos sugiere que la célula puede obtener hierro a partir de la Hb, y también sugiere que la proteína FrpB2 es capaz de conferirle esta habilidad.

Con este ensayo se muestra que la proteína FrpB2 es capaz de conferirle a las células que la expresan la capacidad de obtener hierro a partir de la Hb y con ello poder crecer.

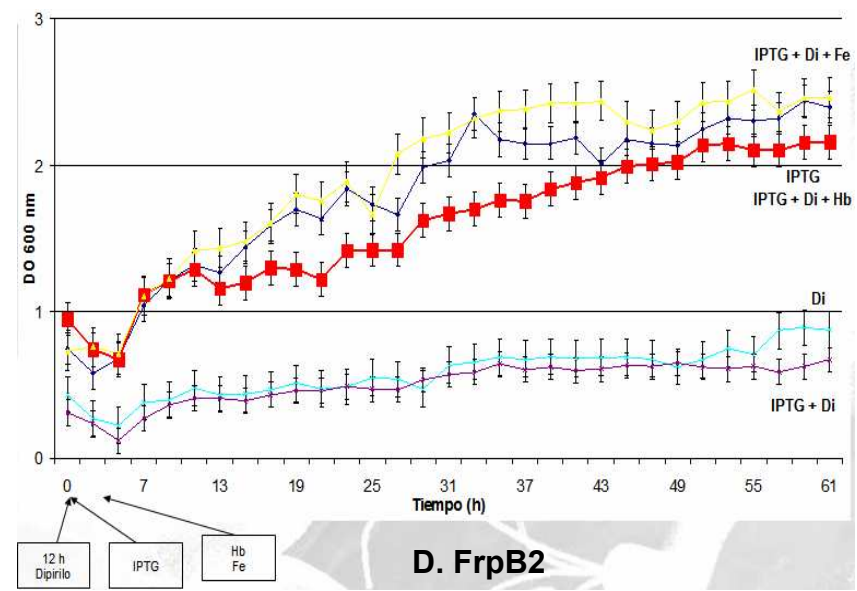
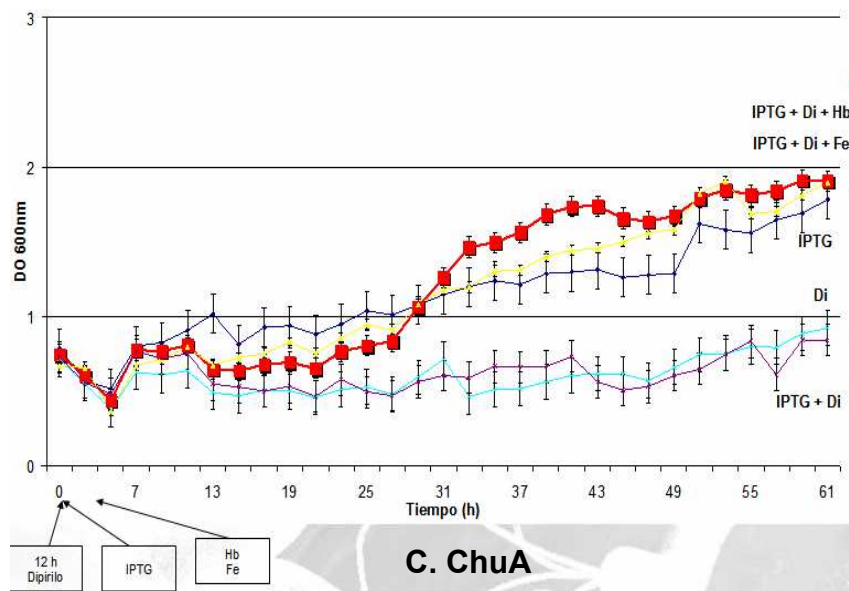
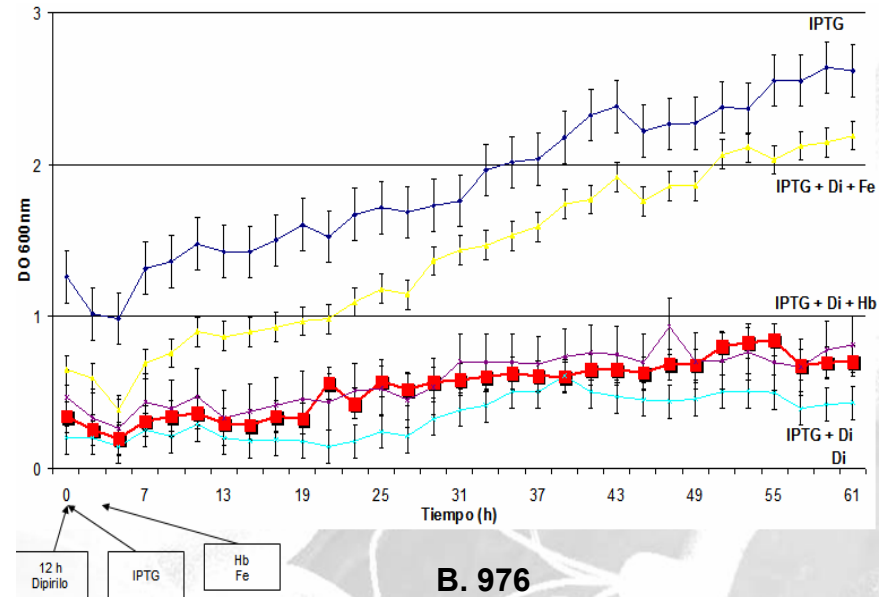
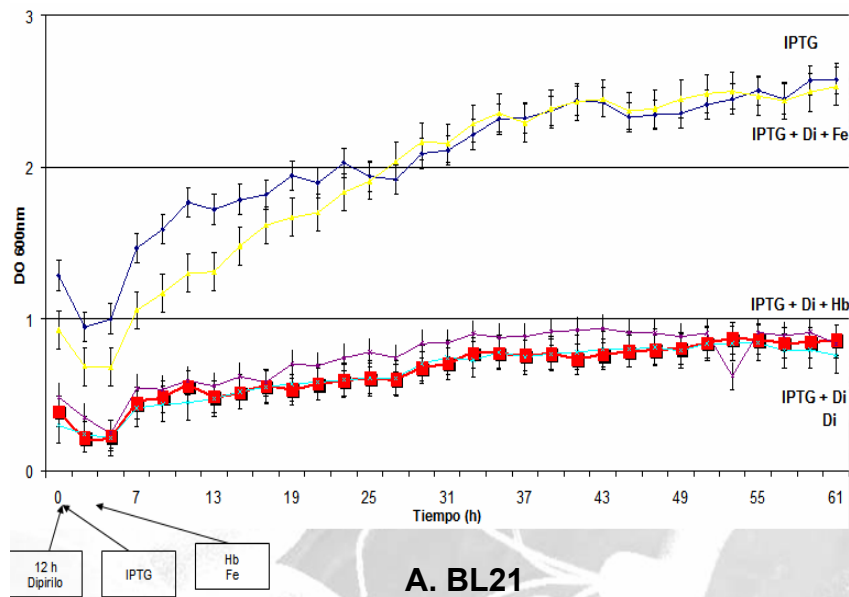


Figura 29. Curvas de crecimiento.

Panel A. curva de crecimiento de células BL21pLys

Panel B. Curva de crecimiento de células BL21pLys transformadas con el plásmido p976.

Panel B. Curva de crecimiento de células BL21pLys transformadas con el plásmido pChuA.

Panel B. Curva de crecimiento de células BL21pLys transformadas con el plásmido pFrpB2.

- ◆ IPTG 1mM
- IPTG 1 mM, 2,-2 dipirilo 250 μ M y Hb 10mM
- ▲ IPTG 1 mM, 2,-2 dipirilo 250 μ M y Fe^{2+} 10mM
- ✕ IPTG 1 mM y 2,-2 dipirilo 250 μ M
- × 2,-2 dipirilo 250 μ M

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que la *proteína hipotética de membrana externa regulada por hierro* FrpB2 de *H. pylori* une Hb. Además el gen *frpB2* sobreexpresado en un medio carente de hierro, suplementado con Hb permite soportar el crecimiento celular

La identificación de la secuencia de aminoácidos de FrpB2 de *H. pylori* se obtuvo al hacer un BLAST empleando la secuencia de aminoácidos de la proteína ChuA de *E. coli* EC EH O157:H7 como sonda. ChuA ha sido reportada como una proteína que es capaz de unir Hb (Torres y col; 1997).

El análisis *in silico*, permitió la identificación de otras dos secuencias hipotéticas: FrpB1 y FrpB3. Las tres secuencias de las proteínas FrpB están clasificadas como *proteínas hipotéticas de membrana externa reguladas por hierro*, y tienen una homología del 96% (Tomb y col; 1997) por lo que posiblemente FrpB1 y FrpB3 también podrían tener la misma función y participar en el mismo mecanismo que FrpB2. Esta situación podría sustentarse con el hecho de que, en *H. influenzae* se han identificado tres proteínas que unen Hb y haptoglobina (Morton y col; 1999)

Dentro del análisis *in silico*, el alineamiento múltiple de aminoácidos permitió identificar los dominios FRAP y NPNL necesarios para la unión a Hb (Simpson y col; 2000).

En el alineamiento de los dominios FRAP y NPNL realizado por Liu y col (2006), no todas las proteínas conservan al 100% estos dominios, en el caso del receptor para Hb (HmuR) de *P. gingivalis* presenta una diferencia en el dominio FRAP, teniendo una Y en lugar de F (YRAP), este cambio conservado no pudiera ser tan reelevante ya que los dos aminoácidos son aromáticos; en cuanto al dominio NPNL, *P. gingivalis* presenta un D en lugar de una N (NPDL), en este caso se

cambia un aminoácido polar sin carga (N) por uno con carga negativa (D), este cambio no afecta la habilidad de la proteína HmuR de unir Hb (Liu y col; 2006).

La secuencia de aminoácidos de FrpB2 de *H. pylori* también presenta variaciones en los dominios FRAP y NPNL, presentando TRGP y NRNL. En el dominio FRAP en lugar de una F (aminoácido aromático) presenta una T (polar no cargado) y en lugar de A (polar) presenta G (apolar). En cuanto a NPNL *H. pylori* presenta una R que tiene carga positiva en lugar de P que es apolar. No obstante a la fecha no se ha determinado que aminoácidos pueden aumentar o disminuir la afinidad por la Hb. Por lo que los dominios encontrados en la secuencia FrpB2 de *H. pylori*, a pesar de tener cambios como los presentados en la secuencia HmuR de *P. gingivalis* (Liu y col; 2006), pueda tener la capacidad de unir Hb.

Además de encontrar los dominios dentro de la proteína. Al comparar la estructura tridimensional de ChuA contra FrpB2 se encontró que ambos tienen la estructura de barril, y que los dominios se localizan en parte externa de las proteínas. Comparando ambas estructuras se aprecia que FrpB2 tiene los dominios mas expuestos que ChuA y esto tal vez exponga mejor al medio externo los dominios TRGP y NRNL y ello mejore la accesibilidad por la Hb.

Los datos en el análisis *in silico* nos sugieren que FrpB2 es una proteína que posiblemente une Hb, para abundar mas sobre esta posible función se diseñó una estrategia que consistió en clonar, expresar y analizar la capacidad de unir Hb mediante ensayos de overlay.

La estructura de FrpB2 sugiere que es una proteína de membrana, al expresarla en *E. coli* y obtener por separado la fracción soluble y la fracción membranal, se encontró, mediante un ensayo de overlay, que FrpB2 se localiza en la fracción membranal; los receptores para Hb encontrados en *E. coli* (ChuA) (Torres y col; 1997), *P. gingivalis* (HmuR) (Simpson y col 2000), *Y enterocolitica* (HemR) (Bracken y col; 1999), *N. meningitidis* (HmbR) (Lewis y col; 1999), *H. ducreyi* (HgbA)

(Elkins; 1995) se localizan en la membrana, esto sugiere que probablemente *H. pylori* expresa FrpB2 a nivel de membrana, lo cual tendrá que ser comprobado por inmunofluorescencia.

En el ensayo *in vitro* (overlay) se demostró que FrpB2 une Hb, sin embargo las condiciones del experimento son diferentes a las encontradas fisiológicamente, por lo que no sabemos si el pH del ensayo (7.8), afecta la afinidad por la Hb.

La bacteria *P. intermedia* une Hb pero esta unión es afectada por el pH, se observó que a pH 5 hay una mayor afinidad por la Hb y conforme se aumenta el pH la afinidad disminuye (Guany col; 2004). En *A. actinomycetemcomitans* la unión de Hb es optima a un pH de 6 (Nagata y col; 2002), y la proteína de unión a Hb de *P. gingivalis* tiene mayor actividad entre los pH 4.5 y 5.0 (Fijimura y col; 1996)

H. pylori durante su proceso invasivo se puede localizar a nivel de mucosa donde el pH es de 2, y posteriormente invadir el epitelio gástrico donde el pH es de 7, (Stingl y col; 2008), se ha hipotetizado que la mayor cantidad de Hb se encuentra al momento de provocar ulceraciones donde el pH es ácido y bajo esta condición *H. pylori* es capaz de crecer (Scott y col; 1998), por lo que la afinidad por la Hb se puede ver mejorada, como en el caso de otras bacterias (Guan y col; 2004, Nagata y col; 2002 y Fijimura y col; 1996)

FrpB2 tiene la habilidad de unir Hb, pero se desconoce si tiene la capacidad de unir otras metaloproteínas como la transferrina, lactoferrina, hemopexina, haptoglobina o el grupo hemo, como en el caso del receptor para Hb de *N. meningitidis* que puede unir el grupo hemo y Hb, *Y. enterocolitica* es capaz de unir el grupo hemo, Hb, mioglobina, haptoglobina unida a Hb, (Bracken y col; 1999), *H. ducreyi* solo puede unir Hb (Elkins y col; 1995)

Se demostró que células que sobreexpresan el gen *frpB2* son capaces de obtener hierro a partir de Hb, pero sería interesante saber si bajo estas condiciones, al agregar una metaloproteína diferente como la lactoferrina o haptoglobina estas células son capaces de utilizar otras fuentes de hierro.

Las tallas moleculares de las proteínas FrpB1, FrpB2 y FrpB3 son 88.5, 90.8 y 97.5 kDa respectivamente (ExPASy), las cuales son mayores a las reportadas por Worst y col (1995), que tienen 48, 50 y 74 kDa, estas proteínas presentan la habilidad de unir el grupo hemo, FrpB2 posiblemente une Hb. Nosotros buscamos proteínas que presentan los dominios FRAP y NPFL y a través de esta búsqueda no localizamos proteínas con las tallas que reporta Worst, por lo que tal vez estas proteínas no tengan estos dominios, y posiblemente participan en otros mecanismos para la adquisición de hierro.

Este trabajo permitió explorar un mecanismo de adquisición de hierro utilizando como fuente de hierro a la Hb, mecanismo basado en la proteína FrpB2 de *H. pylori*, creemos que esta proteína es regulada por hierro y proponemos que se puede activar dependiendo del tejido en el cual se encuentra *H. pylori*.

VI. CONCLUSIONES

La secuencia de aminoácidos de la proteína FrpB2 de *H. pylori*, contiene los dominios FRAP y NPNL que son importantes para la unión de la Hb.

La proteína FrpB2 se localiza en membrana y tiene la capacidad de unir Hb humana.

La proteína FrpB2, cuando es expresada, tiene la habilidad de mantener el crecimiento celular, cuando se utiliza Hb como única fuente de hierro.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andresen HM, Regueira NT y Leighton F. 2006. Estrés oxidativo en el paciente critico. *Rev Med Chile*. 134:649-659
2. Andrews Simon C, Robinsón Andrea K., Rodríguez-Quiñónez Francisco. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* 27:215-237.
3. 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.
4. 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
5. 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.
6. Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE. 2006. *H. pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 35:5599-605.
7. 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.
8. 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.

9. 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.
10. DeCarlo Arthur A., Paramaesvaran Mayuri, Yun Peter I. W. Collyer Charles y Hunter Neil. Domain of Cysteine Proteinases (Gingipains) and Hemagglutinins from the Periodontal Pathogen. *J. Bacteriol.* 181:3784-3791
11. Dhaenens L, Szczebara F, Husson MO. 1997. Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 65:514-8.
12. 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.
13. Elkins C. 1995. Identification and purification of a conserved heme-regulated hemoglobin-binding outer membrane protein from *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun.* 63:1241-5.
14. Fatht Michael j. and Kolter Roberto. 1993. ABC Transporters: Bacterial Exporters. *Microbiol Rev.* 57:995-1017.
15. Forrellat BM, Gauttier du Défaix GH y Fernández DF. 2000. Metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 16 :149-60.
16. 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.* 1996. 64:2339-42.

17. Genco CA, Dixon DW. 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol.* 39:1-11.
18. 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.
19. Horton RH, Moran LA, Ochs RS, Rawn JD and Scrimgeour KG. Principles of biochemistry. Prentice Hall. 2002
20. Husson MO, Legrand D, Spik G, Leclerc H. 1993. Iron acquisition by *Helicobacter pylori*: importance of human lactoferrin. *Infect Immun.* 61:2694-7.
21. 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.
22. Lewis L. A., Gipson M., Hartman K., Ownbey T., Vaughn J. and Dyer D. W. 2002. Phase variation of HpuAB and HmbR, two distinct haemoglobin receptors of *Neisseria meningitidis* DNM2. *Mol Microbiol.* 32:977-989
23. Illingworth DS, Walter KS, Griffiths PL, Barclay R. 1993. Siderophore production and iron-regulated envelope proteins of *Helicobacter pylori*. *Zentralbl Bakteriol.* 280:113-9
24. 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.

25. Martínez SG. 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cubana Farm.* 39:3
26. Mc kee T. y Mc Kee JR. Bioquímica, las bases moleculares de la vida. 3ª edición. Mc Graw Hill. Interamericana. 2003.
27. 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.
28. Nagata H, Ikawa Y, Kuboniwa M, Maeda K, Shizukuishi S. 2002. Characterization of hemoglobin binding to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Anaerobe.* 2002. 8:109-14.
29. Neilands JB. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem.* 270:26723-6.
30. 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.
31. 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.
32. 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.

33. 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
34. Raymond Kenneth N., Dertz Emily A., and Sanggou S. Kim. 2003. Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *PNAS* 100: 3584–3588.
35. Rivas-Traverso Francisco, Francisco Hernández. 2000. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed*; 11:187-205.
36. 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.
37. Schalk IJ, Yue WW, Buchanan SK. 2004. Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. *Mol Microbiol*. 54:14-22.
38. Scott D, Weeks D, Melchers K, Sachs G. 1998. The life and death of *Helicobacter pylori*. *Gut*. 43 Suppl 1:S56-60..
39. 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.
40. 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.

41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Torres AG, and Payne SM. 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol.* 23:825-33.
45. 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.
46. 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.

47. 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.
48. Wandersman C, Delepelaire P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol.* 58:611-47.
49. Wandersman C, Stojiljkovic I. 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol.* 3:215-20.
50. 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.
51. Worst DJ, Maaskant J, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. 1999. Multiple haem-utilization loci in *Helicobacter pylori*. *Microbiology.* 145:681-8.
52. 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.
53. 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

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 09 de Octubre de 2008 en la Ciudad de México D. F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas al Q. F. B. Marco Antonio González López

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda

Dra. Mavil López Casamichana

Dr. Serafín Vivanco Dominguez

Dra. Elizbeth Álvarez Sánchez

Dra. Selene Zárate Guerra

Dr. Mauricio Castañón Arreola
