

11281

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

24

**FUENTES Y RESERVA DE ENERGIA DE *Helicobacter pylori*.  
La pirofosfatasa.**

**Tesis para obtener el grado de**

**Doctora en Ciencias**

**PRESENTA:**

**M. en C. Guadalupe Isabel Oliva Ramírez**

**2001**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Heliodoro Celis Sandoval en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M., con el apoyo de DGAPA (Proyecto PAPIIT No. IN 216598).

---

## AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Dr. Heliodoro Celis Sandoval por haber dirigido este trabajo que me permitió cumplir otra etapa en mi formación académica.

A la Dra. Yolanda López Vidal y a la Dra. Guadalupe Ayala Aguilar que junto con el Dr. Celis formaron mi Comité Tutorial.

A las doctoras Marietta Tuena Sangri, Yolanda López Vidal y Marina Gavilanez Ruíz y a los doctores Edmundo Chávez Cossío, Mario Calcagno Montans, Ruy Pérez Montfort, Juan Pablo Pardo Vázquez y Juan Luis Rendón Gómez, que formaron mi Subcomité de Candidatura al Grado de Doctorado.

A los doctores miembros del jurado: Edgardo Escamilla Marván, Heliodoro Celis Sandoval, Edmundo Chávez Cossío, Ruy Pérez Montfort, Federico Martínez Montes, Juan Luis Rendón Gómez y Francisco Javier Torres López por sus comentarios y sugerencias.

A la Dra. Irma Romero Alvarez por su colaboración, sus valiosas sugerencias y su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

Al Dr. Mark West por su asistencia técnica en el FPLC y en microscopía, así como por la revisión y sus sugerencias en el manuscrito enviado a publicación.

A la M.en C. Silvia Escobedo Martínez por su colaboración técnica.

A Idanelli Barrios y Rosa Isabel Amieba (Maribel) que me enseñaron a cultivar a *Helicobacter pylori*.

A la Sra. Evangelina Vargas por su amable disposición en la orientación administrativa durante mis estudios de posgrado.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio, especialmente a Bernardo por su participación en este proyecto.

A mi hermana Rosa que sin su apoyo no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Universidad Autónoma de Tamaulipas por el apoyo para la realización de mis estudios de doctorado.

A la Secretaría de Educación Pública por haberme otorgado la beca PROMEP (UATAM-118) para Tesis de Doctorado.

---

---

**INDICE****ABREVIATURAS****RESUMEN****ABSTRACT**

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCION.</b>	1
	I.1. Características clínicas de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> .	2
	I.1.1. Epidemiología.	2
	I.1.2. Patogenia.	3
	I.1.3. Anatomía patológica.	4
	I.1.4. Fisiopatología.	5
	I.1.5. Patología gastroduodenal asociada a la infección por <i>H. pylori</i> .	5
	I.1.6. Diagnóstico.	7
	I.1.7. Tratamiento y profilaxis.	8
	I.2. Características de <i>Helicobacter pylori</i> .	9
	I.2.1. Morfología y taxonomía.	9
	I.2.2. Cultivo de <i>H. pylori</i> .	10
	I.2.3. Características generales del genoma.	11
	I.2.4. Metabolismo de <i>H. pylori</i> .	12
	I.2.4.1. Metabolismo de carbohidratos.	13
	I.2.4.2. Metabolismo del piruvato.	16
	I.2.4.3. Ciclo de Krebs.	17
	I.2.4.4. Metabolismo de aminoácidos.	19
	I.2.4.5. Metabolismo de lípidos.	20
	I.2.4.6. Cadena respiratoria.	20
	I.2.4.7. Fosforilación oxidativa.	23
	I.2.4.8. ATPasas tipo P.	24
	I.2.4.9. Pirofosfato y polifosfatos.	24
	I.2.4.10. El PPI y las pirofosfatasas.	29
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS.</b>	31
	II.1. Objetivo general.	31
	II.2. Objetivos particulares.	31
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.</b>	32
	III.1. Materiales.	32
	III.2. Métodos.	32
	III.2.1. Cultivo de bacterias.	32

---

---

III.2.2. Pruebas de identificación de <i>H. pylori</i> .	32
III.2.3. Fraccionamiento celular.	33
III.2.4. Purificación parcial de la PPasa citoplásmica.	33
III.2.5. Determinación de actividad de PPasa y ATPasa.	36
III.2.6. Determinación de proteína.	36
III.2.7. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida y actividad en gel.	36
III.2.8. Análisis de las formas isoméricas de la PPasa por electroforesis.	36
III.2.9. Electroforesis en geles bidimensionales.	37
III.2.10. Electroforesis en condiciones desnaturizantes.	38
III.2.11. Determinación de la masa molecular de la PPasa nativa por filtración en gel.	38
III.2.12. Análisis de la secuencia N-terminal de la PPasa.	38
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION.</b>	<b>39</b>
IV.1. Localización intracelular de la PPasa en <i>Helicobacter pylori</i> .	39
IV.2. Purificación parcial de la PPasa citoplásmica de <i>H. pylori</i> .	40
IV.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la fracción de Sephacryl S-200.	46
IV.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos del N-terminal de la PPasa.	53
IV.5. Determinación de la masa molecular relativa de la PPasa citoplásmica nativa.	54
IV.6. Especificidad de sustrato y propiedades cinéticas de la PPasa citoplásmica.	56
IV.7. Efecto del pH e inhibidores sobre la actividad de la PPasa citoplásmica.	60
<b>V. CONCLUSIONES.</b>	<b>64</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>65</b>
<b>VII. ANEXO.</b>	<b>76</b>
Oliva, G., Romero, I., Ayala, G., Barrios-Jacobo, I. and Celis, H. (2000) Characterization of the inorganic pyrophosphatase from the pathogenic bacterium <i>Helicobacter pylori</i> . Arch Microbiol. 174: 104-110.	

---

---

**ABREVIATURAS**

ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPasa	Adenosín trifosfatasa
BSA	Albúmina sérica bovina
CAPS	Acido 3- ciclohexilamino propanosulfónico
CHES	Acido ciclohexilamino etanosulfónico
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
kDa	Kilodaltones
MES	Acido 2-N-morfolino etanosulfónico
MOPS	Acido 3-N-morfolino propanosulfónico
Pi	Fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato
PPPi	Tripolifosfato
PPasa	Pirofosfatasa
PMSF	$\rho$ -metilsulfonil fluoruro
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCA	Acido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
TPCK	N-tosil-L- fenilalanina clorometil cetona

---

## RESUMEN

*Helicobacter pylori* es un bacilo espiral gram-negativo microaerófilo que actualmente se le reconoce como el principal agente etiológico de la gastritis crónica activa, de la úlcera péptica, del cáncer gástrico y del linfoma tipo MALT en humanos. *H. pylori* contiene gránulos de polifosfato localizados en el citoplasma, el polo flagelar y asociados a la membrana celular. Se propone que los polifosfatos juegan un papel importante en la fisiología de los organismos vivos que incluyen la función de reserva de energía, de fosfato y de regulador metabólico. El más sencillo de los polifosfatos es el pirofosfato y una de las enzimas encargadas de su metabolismo es la pirofosfatasa (PPasa). En este trabajo se investigó la presencia de PPasas en *H. pylori* con el objeto de entender su papel en el metabolismo energético de esta bacteria.

Los cultivos de la cepa 8823 (ATCC 49503) de *H. pylori* se cosecharon, las células se rompieron por sonicación y se fraccionaron por centrifugación diferencial para localizar la actividad de la PPasa. La fracción membranosa presentó una actividad baja de PPasa, que fue 88% sensible a molibdato de sodio, lo que indica que probablemente esta actividad es debida a fosfatasa. En la fracción membranosa se encontró la mayor actividad de PPasa, que fue 100% sensible a NaF (inhibidor de PPasas) y no presentó inhibición con molibdato de sodio. La sensibilidad al fluoruro de la PPasa de *H. pylori* ( $I_{50} = 40 \mu\text{M}$ ) parece ser mayor a la de la mayoría de las PPasas bacterianas.

La purificación parcial de la PPasa citoplásmica se llevó a cabo a través de fraccionamiento con sulfato de amonio y de cromatografía en columnas de Sephacryl S-200,  $\omega$ -aminohexil agarosa-PPi y Mono Q HR 5/5. La enzima se purificó 82 veces con una actividad específica de  $141.7 \mu\text{molas de Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína. El análisis de esta preparación por electroforesis en geles nativos teñidos con plata mostró una banda predominante con  $R_f$  de 0.55. Al sobrecargar el gel de proteína, se observaron otras cuatro bandas de menor movilidad, pero solo la banda con  $R_f$  de 0.55 presentó actividad de PPasa. La electroforesis en geles bidimensionales mostró que la PPasa está compuesta de monómeros de 19.1 kDa. La secuencia del N-terminal es casi idéntica a la que se dedujo de la secuencia de la PPasa de la cepa 26695 de *H. pylori*, demostrándose que la banda de  $R_f$  0.55 es la PPasa de *H. pylori*. El análisis electroforético de la fracción eluida de la columna de Sephacryl S-200 por actividad enzimática mostró dos bandas con  $R_f$  de 0.4 y 0.55. Este patrón de bandas no fue modificado por la adición de los inhibidores de proteasas PMSF y TPCK ( $100 \mu\text{g/ml}$  cada uno) durante la purificación. La composición polipeptídica de las dos bandas de actividad resuelta por electroforesis en geles bidimensionales teñidos con plata mostró una mancha para cada banda de actividad con el mismo peso molecular ( $\sim 19$  kDa). El análisis por gráficas de Ferguson confirmaron que estas dos bandas son oligómeros de peso molecular. La masa relativa molecular de la PPasa nativa determinada por filtración en gel en una columna de Sephacryl S-300 fue de 103 kDa. Estos resultados sugieren que la enzima nativa de *H. pylori* es un hexámero de monómeros idénticos de 19.1 kDa.

La enzima muestra una alta especificidad por  $\text{Mg-PPi}^{2-}$  como sustrato. El pH óptimo de actividad fue de 8.5. La velocidad de reacción a diferentes concentraciones del sustrato sigue una cinética de Michaelis-Menten. La gráfica de Lineweaver-Burk indica una  $K_m$  de  $90 \mu\text{M}$  y una  $V_{\text{max}}$  de  $24.0 \mu\text{molas de Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína. La enzima es absolutamente dependiente de cationes divalentes para su actividad catalítica y el  $\text{Mg}^{2+}$  le confiere la mayor actividad. El  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  pueden remplazar parcialmente al  $\text{Mg}^{2+}$ .

El papel de la PPasa de *H. pylori* parece ser muy claro, como la enzima tiene una localización citoplásmica no participa en la conservación de energía, su función como la de otras PPasas citoplásmicas es mantener la concentración de PPi baja para favorecer la biosíntesis de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, urea y lípidos.



**ABSTRACT**

*Helicobacter pylori* is a gram-negative, microaerophilic bacterium that is now recognized as the principal etiological agent of human chronic gastritis. It is also associated with peptic ulcers and linked to the development of gastric cancer and type MALT lymphoma. *H. pylori* contains polyphosphate granules in the cytoplasm, the flagellar pole and in association with the cell membrane. The physiological function of polyphosphate is believed to play a role which include both energy and phosphorus reserve and metabolic regulator purposes. Pyrophosphate is the simpler form of polyphosphate. One of the enzymes involved in polyphosphate metabolism is the pyrophosphatase (PPase). In this work we investigate the presence of pyrophosphatases (PPases) in *H. pylori* in order to understand its role in the energetic metabolism of the bacterium.

Cultures of *H. pylori* strain 8823 (ATCC 49503) were harvested and fractioned by sonication and centrifugation in order to locate the PPase activities. The fresh membrane fraction contained low PPase activity which was inhibited 88% by sodium molybdate, indicating that this activity is probably due to contaminant. In the soluble fraction significant more PPase activity was recovered, which was 100% sensitive to NaF, a PPase inhibitor, and not inhibited by sodium molybdate. The fluoride sensitivity of *H. pylori* PPase ( $I_{50} = 40 \mu\text{M}$ ) seems to be higher than the majority of bacterial PPases.

The partial purification of *H. pylori* cytoplasmic PPase was achieved through ammonium sulfate fractionation, Sephacryl S-200 column, affinity-exchange chromatography and FPLC-MonoQ anion exchange column. The enzyme was purified 82-fold with a specific activity of  $141.7 \mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ . When such preparation was analyzed by non-denaturing electrophoresis and silver staining, a dominant band was observed with an  $R_f$  value of 0.55. When the gel was overloaded, four additional bands with lower mobility were observed. When an identical segment was tested for enzyme activity by direct reaction on the gel with PPI, a single band of the product was found at the same  $R_f$  value. Two-dimensional gel electrophoresis of the preparation showed the PPase band to be a monomer of 19.1 kDa. The N-terminal sequence of the PPase band is almost identical to the deduced N-terminal amino acid sequence of PPase from *H. pylori* strain 26695, demonstrating that the band of  $R_f$  0.55 is the *H. pylori* cytoplasmic PPase. Fractions eluted from the Sephacryl S-200 column were analyzed by native electrophoresis and enzyme activity. Two zones of liberated Pi were found.  $R_f$  values were 0.4 and 0.55. This band pattern was neither altered by the presence of the protease inhibitors PMSF and TPCK (100  $\mu\text{g/ml}$  each) during purification. The polypeptide composition of these two bands with activity resolved by two-dimensional gel electrophoresis and visualized by silver staining, showed one spot for each of them with the same molecular weight (~19 kDa), suggesting that they are oligomers of the same PPase monomer. Ferguson plot analysis, confirmed that the two bands are molecular weight isomers. The relative molecular mass of the native PPase was estimated by gel filtration on a Sephacryl S-300 column. The enzyme eluted at a position corresponding to  $V_e / V_o = 1.51$ , indicating a molecular weight of 103 kDa. These results suggest that the native cytoplasmic enzyme of *H. pylori* is an hexamer of identical 19.1 kDa monomers.

Cytoplasmic PPase shows high substrate specificity to  $\text{Mg-PPi}^{2-}$ . The pH optimum of the PPase activity is  $\text{pH} = 8.5$ . The reaction rate at different  $\text{Mg-PPi}^{2-}$  concentrations follows a Michaelis-Menten kinetics. A Lineweaver-Burk plot indicates an apparent  $K_m$  equal to 90  $\mu\text{M}$  and a  $V_{\text{max}}$  equal to 24.0  $\mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . The enzyme is absolutely dependent on the presence of divalent cation for its catalytic action, with  $\text{Mg}^{2+}$  conferring the highest activity.  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  could partially replace  $\text{Mg}^{2+}$ , but the effectiveness of the latter cations is limited to a narrow range of concentration.

The role of PPase in *H. pylori* seems very straightforward. As the enzyme has a cytoplasmic localization it has no function in energy conservation. Its function, as other cytoplasmic PPases, is to keep the PPI concentration low. On the other hand the possibility that the hydrolysis of PPI could provide some energy for other biosynthetic pathways cannot be ruled out.

## I. INTRODUCCION

Hasta principios de los años 80, las ideas respecto a la patogenia de la gastritis y la úlcera péptica se centraban en el papel de la secreción ácida y de pepsina (Adams y col., 1981). A partir del descubrimiento, aislamiento y cultivo de *Helicobacter pylori* de la mucosa gástrica humana de pacientes con gastritis crónica por Warren y Marshall (1983), el panorama general de la enfermedad ácido péptica cambió debido a la gran cantidad de trabajos desarrollados para estudiar a *H. pylori* y a las enfermedades asociadas a la infección por este microorganismo. Solo en los últimos años se ha tenido un mayor avance en el estudio del metabolismo básico de *H. pylori* que ha permitido conocer aspectos fisiológicos y bioquímicos de este patógeno (Hazell y col., 1997).

El contar con la secuencia completa del genoma de la cepa 26695 de *H. pylori* (Tomb y col., 1997) ha proporcionado una idea más amplia de sus características biológicas y la publicación de la comparación de este genoma con el genoma de la cepa J99 (Alm y col., 1999) ha servido para profundizar en el conocimiento de la diversidad de esta bacteria. Sin embargo, conocer el genoma completo no es suficiente para entender el mecanismo por el cual *H. pylori* produce la enfermedad (Graham, 1998) y es necesario hacer la integración fisiológica de los resultados de los genes funcionales identificados, las vías metabólicas involucradas y las características bioquímicas observadas en este microorganismo para poder entender su fisiología, la adaptación a su nicho ecológico, su patogenicidad y explicar las características fenotípicas que aún no se han entendido completamente, así como las propiedades que se predicen del genoma y que aún no han sido observadas experimentalmente (Marais y col., 1999).

Actualmente se reconoce a *H. pylori* como el principal agente etiológico de la gastritis crónica activa en humanos (Marshall y col., 1984; Morris y col., 1987; Wyatt y col., 1988), su asociación con la úlcera péptica (Hornick, 1987; Dixon, 1991) y su vínculo al desarrollo de cáncer gástrico (Correa y col., 1990; Parsonnet y col., 1991; Nomura y col., 1991) y al linfoma tipo MALT (tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica) (Wotherspoon y col., 1993; Parsonnet y col., 1994).

El objetivo general de los trabajos realizados sobre *H. pylori* (incluyendo el presente), ha sido obtener conocimiento de la fisiología de la bacteria que ulteriormente pueda permitir identificar blancos potenciales para la intervención terapéutica.

El presente trabajo es parte de un gran proyecto desarrollado en el laboratorio que pretende estudiar las fuentes y reserva de energía de *H. pylori*, las cuales han sido poco y parcialmente estudiadas, no como un todo. Este trabajo comprende el estudio de las pirofosfatasa encargadas de utilizar al compuesto energético más simple que contiene una unión fosfoanhidro de alta energía.

## **I.1. Características clínicas de la infección por *Helicobacter pylori*.**

**I.1.1. Epidemiología.** Estudios seroepidemiológicos realizados a nivel mundial indican que la infección por *H. pylori* se encuentra ampliamente distribuida (Taylor y col., 1991; Pérez-Pérez y col., 1988). La prevalencia de la infección por este microorganismo aumenta con la edad y en personas de bajo nivel socioeconómico (Sitas y col., 1991). En países desarrollados como Estados Unidos, la infección se presenta aproximadamente en el 50% de las personas asintomáticas después de los 50 años de edad, mientras que en niños menores de 10 años rara vez se presenta. En países en vías de desarrollo la infección se adquiere a muy temprana edad (Sitas y col., 1991; Mitchell y col., 1992), lo cual trae como consecuencia la alteración de las funciones del aparato digestivo, provocando que la absorción de los nutrientes sea deficiente en edades críticas del crecimiento, así como la posibilidad de que la gastritis causada por *H. pylori* aumente el riesgo de desarrollar cáncer gástrico a largo plazo (Correa y col., 1990). Estudios realizados en Chiapas, México, reportan una prevalencia de infección por *H. pylori* de 85% en adultos y de 30% en niños (Guarner y col., 1993). La alta prevalencia de la infección en la población infantil de países en vías de desarrollo, así como en las personas que viven hacinadas en habitaciones en donde las condiciones de higiene son deficientes, apoyan la hipótesis de que la infección se transmite de persona a persona a través de la ingestión de comida o agua contaminada con saliva, materia fecal o contenido gástrico (Graham y col., 1990; Lee

y col., 1991). Sin embargo, el mecanismo por el cual se adquiere la infección aún no se conoce.

**1.1.2. Patogenia.** *H. pylori* presenta varias características que se consideran determinantes para su patogenicidad:

**1)** alta motilidad dada por su morfología espiral y la presencia de uno a seis flagelos cubiertos en uno de sus extremos que le permite permanecer en un medio altamente viscoso y resistir el peristaltismo gástrico (Hazell y col., 1986), demostrándose que las cepas más móviles son las más patógenas (Eaton, 1992; Haas y col., 1993; Johensans y col., 1995).

**2)** produce una ureasa (Ferrero y col., 1988), con características únicas dentro de las ureasas bacterianas, que contiene las subunidades UreA y UreB (Mobley y col., 1995) que le permiten sobrevivir en un medio ácido a través de la producción de amonio para neutralizar el pH gástrico, reproduciéndose eficientemente en la capa mucosa gástrica, pero no sobrevive en el lumen gástrico (Dunn y col., 1990).

**3)** produce una catalasa que puede proteger a la bacteria del peróxido de hidrógeno producido por los leucocitos polimorfonucleares (Hazell y col., 1991).

**4)** presenta varias adhesinas que han sido identificadas directamente o por la caracterización de sus receptores celulares (Clyne y col., 1997). La primera adhesina descrita fue una proteína HpaA que se une a un receptor tipo N-acetilneuraminolactosa (Evans y col., 1988) y que es una lipoproteína de la cubierta flagelar que se une a una hemaglutinina fibrilar (Jones y col., 1996); un lipopolisacárido (Piotrowski y col., 1992); y una proteína que funciona como mediadora en la adhesión a antígenos de Lewis de grupo sanguíneo (Boren y col., 1993). La secuencia del genoma (Tomb y col., 1997) ha identificado otras 19 lipoproteínas y 32 miembros de la familia de adhesinas OMP, que pudieran contribuir a la adherencia de la bacteria .

**5)** sintetiza una citotoxina codificada por el gen *vacA* que se produce *in vitro* en el 50-60% de las cepas aisladas, lo que sugiere que la citotoxina no es el único factor involucrado en la úlcera péptica. La proteína se sintetiza en forma de protoxina de 139 kDa e induce la formación de vacuolas en las células gástricas en cultivo y su secuencia de

aminoácidos en la región N-terminal presenta homología parcial con varias proteínas transportadoras o canales iónicos, incluyendo una variedad de ATPasas como es la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa gástrica humana (Cover y col., 1992b). Los inhibidores de la ATPasa vacuolar evitan el efecto vacuolizante inducido por la citotoxina, pero no se sabe si el efecto primario es sobre la citotoxina o sobre una ATPasa celular (Cover y col., 1993). La citotoxina vacuolizante se asocia a una proteína de 128 kDa codificada por el gen *cagA* (Covacci y col., 1993; Tummuru y col., 1993) y es el principal agente inmunogénico, aunque se desconoce su participación en la patogénesis.

6) otras enzimas producidas por *H. pylori* son: una proteasa (Slomiany y col., 1992) que desintegra la estructura polimérica de la mucina y varias lipasas y fosfolipasas (Mauch y col., 1993; Ottlecz y col., 1993) que alteran la capa de fosfolípidos de la superficie apical de las células mucosas produciendo daño celular.

En junio de 1994, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer, una rama de la Organización Mundial de la Salud, declaró a *H. pylori* como un carcinógeno clase 1.

**I.1.3. Anatomía patológica.** Varios estudios histopatológicos de biopsias gástricas obtenidas por endoscopia muestran que las principales características patológicas son: **a)** infiltración de la lámina propia con neutrófilos, monocitos, linfocitos y células plasmáticas y **b)** alteración de la estructura e integridad de las glándulas mucosas epiteliales (Correa y col., 1990). El microorganismo solo coloniza las células epiteliales de la mucosa gástrica de secreción no-ácida y no se ha encontrado en sitios donde las células parietales de secreción ácida son numerosas. La más importante forma de inflamación gástrica es la gastritis tipo B que involucra el antrum gástrico, aunque más tarde puede afectar al fundus. *H. pylori* también se ha identificado en el corpus gástrico cuando se presenta atrofia gástrica, que se caracteriza por la pérdida en el número de glándulas pudiendo llegar éstas a desaparecer y ser sustituidas por células calciformes, hablándose entonces de metaplasia intestinal (López, 1992). También se ha encontrado al microorganismo en el duodeno asociado a células metaplásicas epiteliales gástricas (Wyatt y col., 1987; Lee y

col., 1993; Dubois, 1995). Hasta ahora no se sabe si la lesión inflamatoria precede o mantiene el daño epitelial.

**I.1.4. Fisiopatología.** Si bien es cierto que la infección por *H. pylori* no involucra una respuesta autoinmune, se produce una intensa respuesta inmunológica local y sistémica que se caracteriza por la producción de IgA, la cual se une a los antígenos de *H. pylori in vitro* y cubre a la bacteria *in vivo*, así como por un marcado incremento de IgG plasmática que permanece durante meses después de curar la infección. La infección por este microorganismo desencadena la cascada inflamatoria con la presencia de neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y B y células plasmáticas. La actividad asesina de los linfocitos en sangre periférica se aumenta posiblemente por la estimulación de interleucinas (IL) IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), de otras citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II (Tarkkanen y col., 1993; Peek y col., 1994). Aunque estas respuestas aparentemente hacen muy poco para conferir protección inmunológica contra *H. pylori*, éstas pueden inducir varios cambios en el epitelio gástrico. Por un lado, al tratar de mantener la estructura gástrica normal (provocando un aumento en la liberación de gastrina a la circulación por las células endócrinas G localizadas en el antro gástrico), se produce una hipergastrinemia que estimula a las células parietales gástricas productoras de ácido clorhídrico y como consecuencia aumenta la acidez en el lumen gástrico (hiperclorhidria), manteniéndose la gastritis crónica activa que puede evolucionar a úlcera péptica (Calam y col., 1997). Por otro lado, la cascada inflamatoria puede dañar las células epiteliales gástricas, provocando la pérdida de la estructura glandular normal y conducir a la atrofia gástrica que se manifiesta como hipoclorhidria, la cual se considera un signo previo al adenocarcinoma gástrico (Ernst y col., 1997).

Aún no se sabe por qué la bacteria persiste durante tanto tiempo en el hospedero a pesar de la intensa respuesta inmune.

**I.1.5. Patología gastroduodenal asociada a la infección por *H. pylori*.** Se considera que la enfermedad gastroduodenal asociada a *H. pylori* depende de varios

factores que incluyen el genotipo bacteriano, el genotipo del hospedero y las condiciones fisiológicas y los hábitos dietéticos del hospedero (Go y col., 1994; Mobley, 1996 y 1997).

Una vez adquirida la infección por *H. pylori*, el microorganismo persiste por años y posiblemente durante toda la vida (Blaser, 1993). Aunque la mayoría de las personas infectadas no presenta manifestaciones clínicas de la infección inducida por *H. pylori*, su presencia se asocia con la gastritis crónica activa tipo B (por su localización principal en el antrum gástrico) de acuerdo a la clasificación de Strickland y McKay (López, 1992) y su erradicación siempre es seguida por la remisión de los síntomas de gastritis (Marshall y col., 1984; Morris y col., 1987; Wyatt y col., 1987; Dubois, 1995).

El proceso inflamatorio crónico puede llevar a la aparición de úlcera péptica (Hornick, 1987; Dixon, 1991). Casi todos los pacientes con úlcera duodenal presentan gastritis por *H. pylori* y la recaída de la úlcera es rara después de la erradicación del microorganismo (O'Connor, 1994). La presencia de *H. pylori* es necesaria para la producción de úlcera duodenal, con excepción de las úlceras atribuidas al uso de fármacos antiinflamatorios no-esteroides y al síndrome de Zollinger-Ellison. La infección por *H. pylori* se ha demostrado en casi el 100% de los pacientes con úlcera duodenal (Dixon, 1991). Aunque *H. pylori* solo coloniza la mucosa gástrica, en la úlcera duodenal se ha encontrado al microorganismo asociado a células de metaplasia gástrica (Wyatt y col., 1987; Lee y col., 1993; Dubois, 1995). Se piensa que una vez que *H. pylori* se establece en el duodeno puede producir la ulceración por la liberación de la citotoxina vacuolizante (VacA). También se ha sugerido que las cepas que se asocian a la úlcera duodenal son genéticamente diferentes a las cepas que se asocian a otras enfermedades gástricas (Moss y col., 1992). La evidencia que comprueba lo anterior, es que el 100% de los pacientes con úlcera duodenal presentan anticuerpos contra la citotoxina vacuolizante, mientras que solo en el 61% de los pacientes infectados con *H. pylori* que no presentan úlcera se detectan estos anticuerpos (Cover y col., 1990).

La asociación de *H. pylori* con la úlcera gástrica no es tan alta, debido a que el microorganismo solo se ha encontrado en el 70 a 80% de los pacientes con úlcera gástrica (Hornick, 1987; Dixon, 1991, Dubois, 1995); muchos casos de úlcera gástrica en personas

no infectadas se relacionan con la ingestión de fármacos antiinflamatorios no-esteroides (Dixon, 1991; Cover y col., 1992a).

La infección de *H. pylori* también es un factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. La patogénesis del cáncer asociado a la infección es un proceso complejo y poco entendido; sin embargo, en algunas personas infectadas, la gastritis crónica de larga duración (20 a 40 años) progresa a la atrofia gástrica que *per se* se considera una lesión precancerosa que conduce a la carcinogénesis, aún en ausencia de *H. pylori* (Correa y col., 1990; Nomura y col., 1991; Parsonnet y col., 1991, Blaser, 1993; Lee y col., 1993, Dubois, 1995).

Otro tipo de neoplasia que se encuentra asociada a la infección de *H. pylori* es el linfoma tipo MALT (tejido linfoide asociado a la mucosa) de bajo grado, llamado comúnmente maltoma gástrico. Algunos trabajos han demostrado que el tratamiento de erradicación de *H. pylori* produce la completa remisión histológica y endoscópica de los maltomas de bajo grado de malignidad; sin embargo, los maltomas que evolucionan a alto grado de malignidad son resistentes al tratamiento de este microorganismo (Wotherspoon y col., 1993; Parsonnet y col., 1994).

**I.1.6. Diagnóstico.** Actualmente se dispone de diferentes métodos de diagnóstico que se clasifican en invasivos y no-invasivos (van Zwet y col., 1998). Los primeros incluyen a todos aquellos en los que se emplea la endoscopia para tomar una muestra de biopsia gástrica que es utilizada inmediatamente para probar la actividad de ureasa (CLO test, Pylori-Tek) (Elitsur y col., 1998), o bien, para identificar histológicamente a *H. pylori* a través de diferentes tinciones o mediante su cultivo. La biopsia también puede emplearse en procedimientos moleculares (PCR, hibridación *in situ*) que identifiquen al gen *cagA* (gen de la proteína asociada a la citotoxina) o al gen *vacA* (gen de la citotoxina) (van Zwet y col., 1998). Los resultados negativos de identificación del bacilo en biopsias gástricas no excluyen la posibilidad de la infección debido a que la colonización de *H. pylori* es focal y la biopsia puede no incluir esta área.

Los métodos de diagnóstico considerados no-invasivos incluyen pruebas inmunológicas y pruebas respiratorias. Las primeras consisten en el análisis por inmunoblot



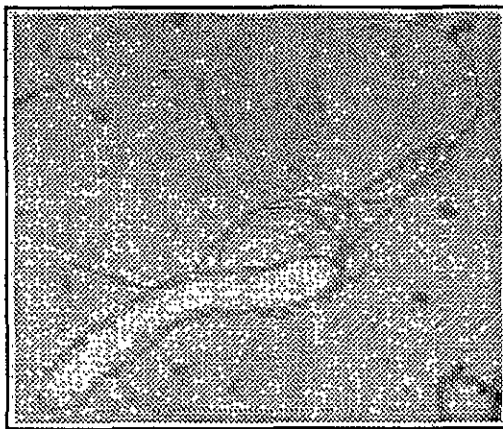
de las inmunoglobulinas (Ig) A e IgG, o la determinación de sus niveles en plasma y saliva; o bien, la detección de anticuerpos contra la proteína CagA (proteína asociada a la citotoxina) o contra VacA (citotoxina) (van Zwet y col., 1998). Recientemente se dispone de la detección de antígenos de *H. pylori* en heces fecales (Vaira y col., 1998). En las pruebas respiratorias se emplea la administración oral de urea marcada con C<sup>13</sup> o C<sup>14</sup>, (Pytest y Meretek, respectivamente) y se hace la detección de C<sup>13</sup> o C<sup>14</sup> en el aliento a través de un contador de centelleo o de un espectrómetro de masas (Graham y col., 1987; Kim y col., 1997; McColl y col., 1997).

**1.1.7. Tratamiento y Profilaxis.** Aunque *H. pylori* es sensible a muchos antimicrobianos *in vitro*, ha sido difícil erradicarlo del estómago. Los tratamientos recomendados en 1996 por el Instituto Nacional de Salud (NIH) en EUA, no han variado mucho. La terapia más efectiva ha resultado del empleo de dos o tres antibióticos administrados por lo menos durante una semana a base de sales de bismuto, metronidazol y amoxicilina o tetraciclina o claritromicina (Chiba y col., 1992). El uso de un antibiótico asociado con fármacos antagonistas de receptores H<sub>2</sub> (ranitidina) no ha dado buenos resultados en contraste con la administración de un inhibidor de la bomba de protones (omeprazole) con amoxicilina o claritromicina (Graham y col., 1993; Logan y col., 1994). La eliminación de la infección alivia la gastritis y disminuye la incidencia de úlcera duodenal.

La antibioticoterapia empleada para la erradicación de *H. pylori* continúa teniendo muchas limitaciones como son el alto costo, el que los pacientes no cumplen al 100% el tratamiento, los efectos adversos que se presentan y los riesgos de selección de cepas resistentes. Desde hace algunos años, diferentes grupos comenzaron a trabajar en la elaboración de vacunas para uso profiláctico y terapéutico a través de la inmunización oral (Czinn y col., 1991; Lee, 1996). Se han desarrollado dos modelos animales, uno en ratón (Lee y col., 1990) y otro en hurón (Fox y col., 1990) en los que se han utilizado homogenados de *H. felis* (Chen y col., 1992) que es la especie más relacionada filogenéticamente a *H. pylori*, o bien, proteínas recombinantes como la ureasa (Corthesy-Theulaz y col., 1994), empleando como adyuvantes a las toxinas termolábiles de *Vibrio cholerae* o *Escherichia coli* (Lee y col., 1994; Czinn, 1991).

## I.2. Características de *Helicobacter pylori*.

**I.2.1. Morfología y taxonomía.** En frotis de cultivos teñidos con hematoxilina y eosina, Gram, Giemsa, Genta o Warthin-Starry, *H. pylori* puede observarse en el microscopio de luz como un bacilo gram negativo en forma curva, espiral o de "alas de gaviota". A través de microscopía electrónica se observa que la bacteria tiene una longitud de 2.5 a 3.5  $\mu\text{m}$  y de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una periodicidad en la espiral de 1 a 2  $\mu\text{m}$ . Presenta superficies lisas y de cuatro a seis flagelos polares cubiertos, de aproximadamente 30 nm de diámetro que emergen de uno de sus extremos redondos, con un bulbo terminal cuya función aún no se ha determinado (Fig. 1) (Jones y col., 1985).



**Fig. 1. Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori*.** Bacilo espiral que presenta de cuatro a seis flagelos cubiertos en uno de sus polos, cada uno con un bulbo terminal.

La forma más común que presenta *H. pylori* durante la infección humana es la forma bacilar, aunque también se han encontrado formas cocoides que infectan la mucosa gástrica (Chan y col., 1994). El cambio de la morfología bacilar a cocoide se ha observado durante la privación de nutrientes (West y col., 1990), la exposición a antibióticos (Bode y col., 1993a) o cuando se prolonga el tiempo de incubación, aun cuando se cultive bajo

condiciones adecuadas (atmosféricas y de nutrientes) (Catrenich y col., 1991; Moshkowitz y col., 1994). Existe controversia en relación a la viabilidad de la forma cocoide y su posible papel en la transmisión de la infección (Bode y col., 1993a; Eaton y col., 1995, Benaïssa y col., 1996; Sörberg y col., 1996), aunque las formas cocoides ya no son cultivables (Bode y col., 1993a; Catrenich y col., 1991).

Originalmente se clasificó a este microorganismo dentro del género *Campylobacter* por sus características morfológicas, la composición de las bases de su ADN y los requerimientos para su cultivo, por lo que se nombró *Campylobacter pyloridis* (Marshall y col., 1987). Posteriormente en 1989 se reclasificó y denominó *Helicobacter pylori* con base en su análisis ultraestructural, a la composición de sus ácidos grasos y a la secuencia del ARN ribosomal 16S (Goodwin y col., 1989).

*H. pylori* pertenece al dominio eubacteria (Woese y col., 1990), dentro del grupo de bacterias púrpura no-sulfurosas (Stackerbrandt y col., 1988). El análisis de la secuencia del ARN ribosomal 16S relaciona al género *Helicobacter* con *Campylobacter*, *Wolinella*, *Arcobacter* y *Thiovulum*. Se clasifica dentro de la subdivisión epsilon de las Proteobacterias. Actualmente el género *Helicobacter* incluye más de 70 especies ([www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/)), algunas que colonizan, como en el humano, la mucosa gástrica de otros animales y muchas de estas especies también son patógenas (Stanley y col., 1993). Se han encontrado tres especies que colonizan el intestino y otras dos hepáticas (Fox y col., 1995).

**1.2.2. Cultivo de *H. pylori*.** Por su naturaleza microaerofílica, *H. pylori* requiere de una atmósfera que contenga 5-10% (v/v) de O<sub>2</sub>, 5-10% (v/v) de CO<sub>2</sub> y 80-85% (v/v) de N<sub>2</sub>. Se han empleado medios de cultivo enriquecidos con moléculas orgánicas complejas como son sangre, peptona y extracto de levadura; así como medios de cultivo que contienen almidón, suero fetal bovino, carbón activado, catalasa y ciclodextrinas para estimular el crecimiento bacteriano (Buck y col., 1987; Westblom y col., 1991; Olivieri y col., 1993).

En 1994 dos trabajos independientes (Reynolds y Penn, 1994; Nedenskov, 1994) desarrollaron un medio definido para el cultivo de *H. pylori* que permitieron determinar que los aminoácidos arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y valina son

esenciales para este microorganismo. Otros trabajos (Marshall y col., 1984; McNulty y col., 1987) habían señalado que *H. pylori* podía cultivarse en ausencia de carbohidratos. Posteriormente Nedenskov (1994) demostró que el microorganismo no requiere glucosa para su cultivo, sugiriendo que *H. pylori* utiliza a los aminoácidos como fuente de carbono y energía. Estos datos fueron posteriormente apoyados por Mendz y Hazell (1995) y confirmados por los resultados de la secuencia del genoma que indican la ausencia aparente de los genes que codifican algunas de las enzimas claves en las vías biosintéticas de los aminoácidos antes mencionados (Tomb y col., 1997).

Se considera a *H. pylori* como una bacteria de crecimiento lento, debido a que presenta un tiempo de duplicación de 4-8 horas en condiciones óptimas, comparado con el tiempo de duplicación (20 min) de *E. coli* (Morgan y col., 1987).

**1.2.3. Características generales del genoma.** El genoma completo de dos cepas de *H. pylori* no relacionadas, la 26695 (Tomb y col., 1997) y la J99 (Alm y col., 1999), han sido secuenciadas de cromosomas circulares que contienen 1,667,867 pb y 1,643,831 pb, respectivamente. El análisis comparativo del genoma de las dos cepas ha demostrado que aunque los cromosomas están organizados de manera diferente en un número limitado de regiones pequeñas, el tamaño del genoma, el contenido genético y el orden de los genes en las dos cepas es extraordinariamente similar. El promedio del contenido de G+C es de 39%, pero cinco regiones del genoma de la cepa 26695 (nueve en la J99) tienen una composición distinta (Alm y col., 1999).

Los dos genomas de *H. pylori* se encuentran altamente conservados con respecto al contenido de genes, en la cepa 26695 se identificaron 1,552 marcos de lectura abierta (ORFs), que representa el 91% del cromosoma y en la cepa J99 se identificaron 1,495 ORFs, que corresponde al 90.8% del cromosoma. En ambas cepas, aproximadamente al 58% de los productos génicos se les ha asignado una función putativa con base en la similitud de la secuencia de proteínas de función conocida; alrededor del 18% de los productos génicos se encuentran conservados en otras especies pero no se conoce su función; y cerca del 23% se han designado específicos de *H. pylori*. Los genes específicos

que se encontraron fueron 117 y 89 para las cepas 26695 y J99, respectivamente (Alm y col., 1999).

La comparación de genes ortólogos y sus productos codificados muestran un alto grado de conservación. La variación en la secuencia entre las cepas 26695 y J99 fue significativamente mayor a nivel de nucleótido que a nivel de aminoácido. Debido a que la variación de un nucleótido ocurre más frecuentemente en la tercera posición de un triplete codificador, la secuencia primaria de la proteína codificada se encuentra altamente conservada. El hecho de que muchas de las diferencias de nucleótidos son silenciosas con respecto a la secuencia de la proteína, sugiere que existe una fuerte presión selectiva para la conservación de la función a nivel de la proteína. El desplazamiento del nucleótido de la tercera posición de un triplete codificador probablemente sea el responsable de la "diversidad" reportada para *H. pylori*, basada en el análisis del ADN. Aunque el contenido genético y las capacidades fisiológicas resultantes de las cepas 26695 y J99 son casi idénticas, las pocas diferencias en el arreglo de los genes hacen que estas cepas se consideren como diversas (Doig y col., 1999).

**1.2.4. Metabolismo de *H. pylori*.** En el estudio de *H. pylori* y de las enfermedades asociadas a la infección por este microorganismo se han desarrollado una gran cantidad de trabajos enfocados principalmente en las áreas de epidemiología, clínica y terapéutica, debido a la característica de ser un patógeno humano y a la alta prevalencia de la infección a nivel mundial. Solo en los últimos años se ha tenido un mayor avance en el estudio del metabolismo básico de *H. pylori* que ha permitido conocer aspectos fisiológicos y bioquímicos de este patógeno (Hazell y col., 1997). Con el análisis reciente de la secuencia completa de las cepas 26695 (Tomb y col., 1997) y J99 (Alm y col., 1999) de *H. pylori*, el interés en su metabolismo ha aumentado.

La mayor parte de los datos experimentales de las actividades bioquímicas, presentes o ausentes en *H. pylori*, coinciden con las capacidades metabólicas que se predicen del genoma; sin embargo, aún quedan por comprobar las predicciones de algunas vías metabólicas y las funciones de algunos productos génicos, y hacer un análisis más

detallado del genoma debido a que *H. pylori* presenta actividades bioquímicas para las cuales no se ha identificado una secuencia codificadora.

El análisis del genoma ha mostrado varias vías metabólicas en las cuales no se han identificado todos los genes que deberían estar presentes para que esa vía sea funcional, lo cual indica que probablemente algunos de estos genes podrían no estar presentes en el genoma, o bien, que los genes no identificados en las vías metabólicas aparentemente incompletas, observadas en las dos cepas de *H. pylori*, podrían ser diferentes a otros genes ortólogos previamente descritos. Estos genes podrían estar dentro del 40% del genoma al cual aun no se le ha asignado una función.

Los detalles de aspectos metabólicos, fisiológicos y genéticos de *H. pylori* han sido descritos ampliamente en la literatura (Hazell y col., 1997; Kelly, 1998; Marais y col., 1999; Doig y col., 1999), por lo que a continuación se presentarán solo algunas características metabólicas relacionadas con el metabolismo energético de este microorganismo.

**1.2.4.1. Metabolismo de carbohidratos.** Los primeros trabajos señalan que la bacteria no tiene la capacidad de fermentar azúcares, con base en que puede cultivarse en ausencia de carbohidratos (Marshall y col., 1984; McNulty y col., 1987). Sin embargo, se ha demostrado que *H. pylori* es capaz de utilizar glucosa como única fuente de carbohidratos y que es captada del medio por una proteína transportadora específica para D-glucosa y su transporte es dependiente de sodio (Burns y col., 1993; Mendz y col., 1995a). En el interior de la célula, la glucosa es fosforilada por una glucocinasa, en lugar de una hexocinasa (Menz y col., 1993a). La glucosa-6-fosfato puede entrar a la vía de las pentosas generando poder reductor y produciendo pentosas-fosfato necesarias para la síntesis de nucleótidos y de ciertos aminoácidos (Menz y col., 1991); o bien, puede entrar a la vía de Entner-Doudoroff como vía alterna a la glucólisis para la oxidación de glucosa a piruvato (Fig.2). Aunque esta vía produce un potencial de energía menor que la glucólisis, permite a la bacteria metabolizar ácidos aldónicos (como el gluconato), que pueden representar *in vivo* una importante fuente de nutrientes (Menz y col., 1994a). Al parecer esta vía es constitutiva en *H. pylori*.

Todos los genes involucrados en la vía de las pentosas se han identificado, excepto el gen de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, lo que ha sugerido la existencia de una proteína con función similar pero con características diferentes a otras 6-fosfogluconato deshidrogenasas (Marais y col., 1999).

En el estudio bioquímico de la vía de la glucólisis en este microorganismo, se ha presentado controversia. Algunos autores no han encontrado actividad catalítica de algunas de las enzimas glucolíticas (Mendz y col., 1994a; Chalk y col., 1994) y otros han reportado actividad glucolítica y de gluconeogénesis (Hoffman y col., 1996). El análisis del genoma ha identificado a los genes homólogos de las siete enzimas que llevan a cabo las reacciones reversibles que son comunes a la vía glucolítica y de la gluconeogénesis; sin embargo, de los tres pasos enzimáticos irreversibles de la glucólisis/gluconeogénesis, no se han identificado dos de los genes de las enzimas glucolíticas (fosfofructo cinasa y piruvato cinasa) y el gen de la glucosa 6-fosfatasa de la gluconeogénesis (Tomb y col., 1997) (Fig.2). Estos datos han sugerido que *H. pylori* utiliza las enzimas de la vía glucolítica/gluconeogénesis hacia la vía biosintética, mas que para la obtención de energía (Hoffman y col., 1996).

En el caso de la glucólisis y de la gluconeogénesis, el análisis del genoma ha sido de utilidad para confirmar algunos datos experimentales, pero al mismo tiempo, ha mostrado la necesidad de verificar estas vías metabólicas. Por otro lado, la coexistencia inusual en el metabolismo bacteriano de las dos vías oxidativas de la glucosa, la glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas) y la de Entner Doudoroff en *H. pylori*, hace necesario investigar más sobre este aspecto (Hazell y col., 1997).

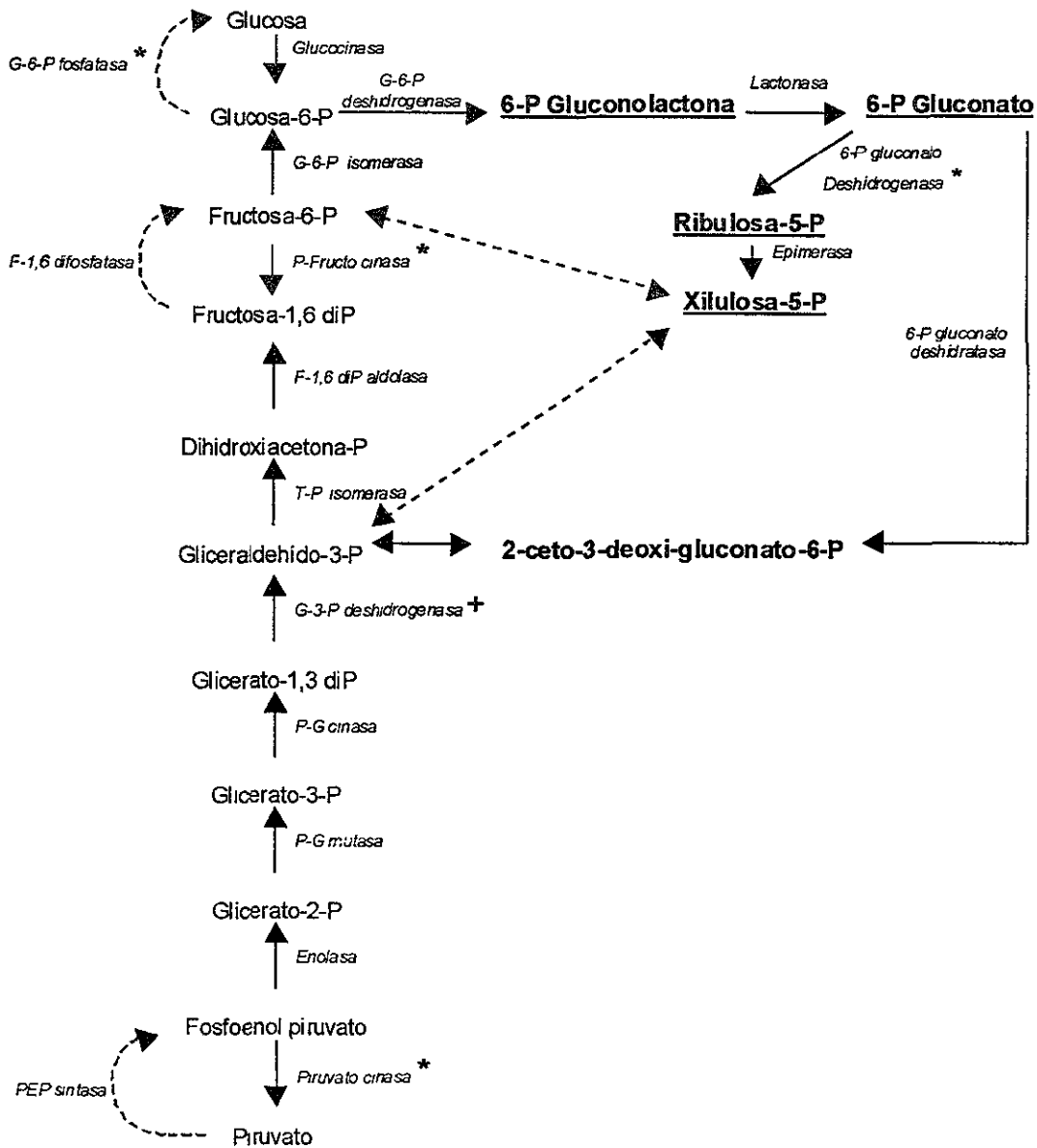


Fig.2. Metabolismo de carbohidratos en *H. pylori*. Vía de las pentosas fosfato abreviada y subrayada. Vía de Entner Doudoroff (negritas). Glucólisis/gluconeogénesis se presenta con los mismos pasos reversibles, señalando los pasos unidireccionales (—) de la gluconeogénesis.

\* actividad enzimática reportada, pero el gen no ha sido identificado.

+ gen identificado, pero no se ha reportado la actividad enzimática.

(Modificado de Marais y col., 1999).



**1.2.4.2. Metabolismo del piruvato.** El piruvato, producto final tanto de la vía glucolítica, como de la vía de Entner Doudoroff, se considera como uno de los principales cruces metabólicos de vías que conducen a la conservación de energía o a la biosíntesis de productos importantes.

Las células incubadas con piruvato en condiciones anaeróbicas producen lactato, etanol y acetato, mientras que en condiciones aeróbicas, el principal producto es el acetato (Chalk y col., 1994). En condiciones microaerofílicas, el piruvato se metaboliza a lactato, (vía lactato deshidrogenasa), acetato, formato, succinato y alanina. La formación de succinato sugiere la incorporación del piruvato al ciclo de Krebs y la síntesis de alanina apoya la idea de que el piruvato podría jugar un papel importante en procesos biosintéticos. La formación de lactato, etanol y acetato sugieren la utilización del piruvato en la vía fermentativa (Mendz y col., 1994b).

Algunos trabajos han identificado una alcohol deshidrogenasa con alta actividad específica a etanol. Estos trabajos se han enfocado en la generación de acetaldehído y su participación en la patología gástrica (Salmela y col., 1993, 1994); sin embargo, aún falta mucho por entender el papel de esta enzima en el metabolismo de *H. pylori*.

El piruvato puede ser descarboxilado para formar acetil-CoA mediante la acción de una piruvato:flavodoxina oxidoreductasa (**POR**) (Fig.3), una enzima asociada generalmente al metabolismo anaeróbico, en lugar de una piruvato deshidrogenasa aeróbica o de una piruvato-formato liasa anaeróbica estricta y entrar al ciclo de Krebs. La **POR** de *H. pylori* presenta características descritas solo en organismos hipertermófilos, como es una alta sensibilidad a oxígeno. La purificación de ésta enzima en presencia de oxígeno y en ausencia de dithiothreitol da como resultado una rápida inactivación, siendo muy probable que ésta propiedad sea la principal contribución al fenotipo microaerofílico de la bacteria (Hughes y col., 1995). En extractos celulares de *H. pylori*, incubados anaeróbicamente, se ha observado la reducción de NADP dependiente de **POR**, pero no la reducción de NAD, implicando la presencia de una actividad de flavodoxina NADP reductasa. Esta característica puede ser importante para la conservación de energía en *H. pylori*, debido a que el NADPH parece ser el nucleótido preferido como donador de electrones a la cadena respiratoria en lugar del NADH. La **POR** y la  $\alpha$ -cetoglutarato:aceptor oxidoreductasa (**OOR**)

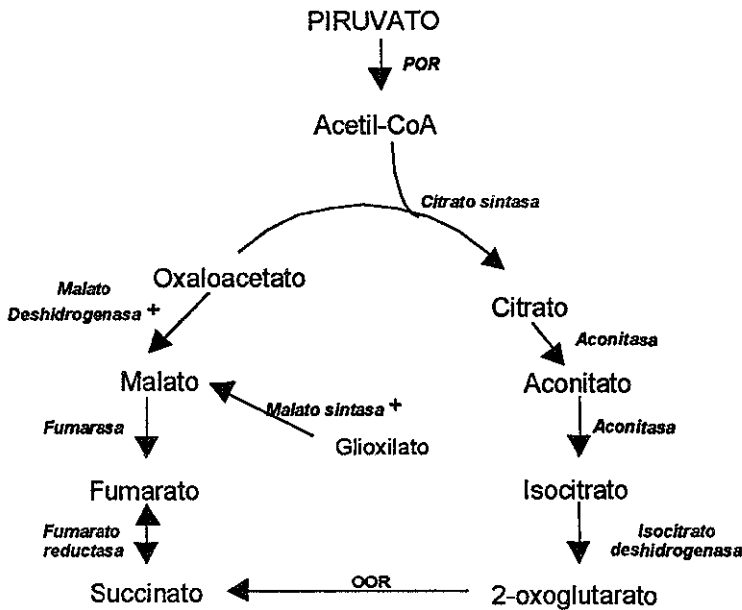
(descrita más adelante), son enzimas cruciales en *H. pylori* para la generación de acetil-CoA y succinil CoA con propósitos biosintéticos, así como para proveer de electrones a la cadena respiratoria (Hughes y col., 1998).

**1.2.4.3. Ciclo de Krebs.** El ciclo de Krebs en esta bacteria se encuentra bifurcado, con el brazo de los ácidos dicarboxílicos trabajando en reversa (reductivamente) de oxaloacetato a succinato; mientras que el brazo de los ácidos tricarboxílicos procede oxidativamente de acetil-CoA a  $\alpha$ -cetoglutarato (Mendz y col., 1993b). La función principal del brazo oxidativo es proveer succinil CoA y NADPH para la biosíntesis y la respiración. El brazo reductivo puede funcionar para la respiración con fumarato. Ambos brazos metabólicos requieren oxaloacetato como punto de inicio, sin embargo, el mecanismo exacto para la producción de oxaloacetato no se conoce, debido a que las actividades y los genes de las enzimas piruvato carboxilasa, fosfoenol piruvato (PEP) carboxilasa y PEP carboxicinasa no se han identificado. La ausencia del complejo de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (Hoffman y col., 1996) y de la succinil-CoA sintetasa (Pitson y col., 1999) ha sido confirmada por el análisis del genoma (Tomb y col., 1997); sin embargo, se ha reportado la actividad de una  $\alpha$ -cetoglutarato:aceptor oxidoreductasa (**OOR**), que cataliza la conversión directa de  $\alpha$ -cetoglutarato a succinato (Hoffman y col., 1996; Pitson y col., 1999)(Fig.3), que presenta gran similitud con la enzima de arqueobacterias (Hughes y col., 1998).

La identificación de una fumarato reductasa, que al parecer reemplaza funcionalmente a la succinato deshidrogenasa, es de importancia, porque sugiere que el fumarato por esta vía metabólica podría actuar como un aceptor terminal de electrones en la respiración anaeróbica. La fumarato reductasa en *H. pylori* es una enzima constitutiva y ligada a la membrana plasmática (ver más adelante cadena respiratoria y Fig. 4), que al no estar presente en el humano, se ha propuesto como blanco terapéutico contra este microorganismo (Mendz y col., 1995b).

Los genes que codifican un homólogo de la succinato deshidrogenasa no han sido identificados, aunque se ha observado su actividad en extractos de varias cepas de *H. pylori*, incluyendo la J99 (Doig y col., 1994; Hoffman y col., 1996). Esta aparente

discrepancia pudiera ser explicada debido a que *in vitro*, la fumarato reductasa puede convertir al succinato en fumarato.



**Fig. 3. Descarboxilación del piruvato y ciclo de Krebs en *H. pylori*.** Descarboxilación del piruvato por la piruvato:flavodoxina oxidoreductasa (POR). El ciclo de Krebs se encuentra incompleto, con el lado de los ácidos dicarboxílicos trabajando reductivamente de oxaloacetato a succinato, mientras que el lado de los ácidos tricarboxílicos procede oxidativamente de acetil-CoA a  $\alpha$ -cetoglutarato. En este organismo se ha identificado el gen y la actividad de la  $\alpha$ -cetoglutarato:aceptor oxidoreductasa (OOR) que cataliza la conversión directa  $\alpha$ -cetoglutarato a succinato.

+ actividad enzimática reportada sin identificación de la secuencia codificadora.

La actividad de la malato deshidrogenasa y la malato sintasa se ha determinado en *H. pylori* (Pitson y col., 1999); sin embargo, los genes que codifican a estas enzimas no han sido identificados, lo que sugiere la presencia de enzimas que lleven a cabo una función similar pero que presenten diferencias en la secuencia de aminoácidos. Estos datos indican que debe tenerse cuidado al tomar en cuenta las características funcionales y metabólicas

de un organismo cuando se basan solamente en el análisis de la secuencia del genoma y que es necesario verificar los resultados por otra vías.

El tipo de respiración anaeróbica con fumarato como aceptor, combinado con el metabolismo del piruvato y la presencia de **POR** y **OOR**, apoyan la existencia de un metabolismo anaeróbico en *H. pylori*, pero al requerir O<sub>2</sub> para su cultivo, refleja el carácter microaerofílico de esta bacteria.

**1.2.4.4. Metabolismo de aminoácidos.** Los aminoácidos son fuente importante de carbono, nitrógeno y energía (Reynolds y col., 1994; Mendz y col., 1995). Aunque Reynolds y Penn (1994) observaron que alanina aumenta el crecimiento bacteriano en presencia de glucosa, Mendz y Hazell (1995) demostraron que *H. pylori* puede cultivarse en un medio sin glucosa utilizando arginina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina y serina como únicos sustratos, observando como productos principales del catabolismo de aminoácidos a acetato, formato, succinato y lactato. Estos resultados muestran que los aminoácidos pueden ser los nutrientes básicos para este microorganismo. Además, la glucosa añadida al medio de cultivo compuesto por una mezcla de aminoácidos no es utilizada hasta que los otros nutrientes han disminuido significativamente del medio (Menz y col., 1993).

Se ha demostrado que este microorganismo puede utilizar a la urea para la síntesis de aminoácidos (Williams y col., 1996). La desaminación de los aminoácidos conduce al aumento de nitrógeno intracelular (Hughes y col., 1995; Burns y col., 1995), que se resuelve por la acción concertada de la ureasa con el ciclo de la urea, actuando como "bomba" de nitrógeno hacia el espacio extracelular para mantener el balance nitrogenado (Moble y col., 1995; Mendz y col., 1996).

El estudio de sistemas de captación y vías de degradación y biosíntesis de purinas y pirimidinas (Menz y col., 1994c; 1994d) sugiere que *H. pylori* utiliza varios sustratos como fuente de nitrógeno, que incluyen urea, amonio y algunos aminoácidos como alanina, serina y glutamina. El análisis del genoma ha confirmado estos datos (Tomb y col., 1997).

La asimilación de amonio, un producto abundante por la actividad de la ureasa, se lleva a cabo por la glutamino sintetasa, que transforma al glutamato en glutamina y el  $\alpha$ -

etoglutarato se transforma en glutamato por la acción de una glutamato deshidrogenasa en lugar de una glutamato sintetasa (Mobley y col., 1995).

**1.2.4.5. Metabolismo de lípidos.** Los lípidos podrían ser utilizados como fuente de carbono y energía, y los fosfolípidos como una fuente potencial de fosfato. Aunque existe poca información disponible acerca del metabolismo de los ácidos grasos y de los fosfolípidos en *H. pylori*, el análisis detallado de la secuencia de su DNA ha permitido conocer algunas características del metabolismo lipídico. Las dos cepas de *H. pylori* secuenciadas contienen los genes necesarios para el catabolismo de ácidos grasos de cadena corta y de un transportador para estos ácidos grasos. Se han identificado los genes de la acil-CoA sintetasa, enzima que se encarga de la activación de los ácidos grasos libres, y de la 3-cetoacil-CoA tiolasa, una de las cuatro enzimas que se requieren para la  $\beta$ -oxidación (Tomb y col., 1997). Con respecto a la degradación de los fosfolípidos, se ha demostrado la existencia de fosfolipasas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y C (Ottlecz y col., 1993).

La biosíntesis de ácidos grasos en esta bacteria se ha demostrado por la presencia de la acetil-CoA carboxilasa, una enzima que fija CO<sub>2</sub> a la acetil-CoA para la síntesis de malonil-CoA, primer paso de la biosíntesis (Burns y col., 1995).

El análisis del genoma ha identificado una gran cantidad de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, sin embargo, los resultados de muchos de estos análisis aún no han sido estudiados experimentalmente.

**1.2.4.6. Cadena respiratoria.** Los aceptores terminales de la cadena respiratoria pueden ser oxígeno (respiración aeróbica) u otros sustratos (respiración anaeróbica). Los sistemas respiratorios, además de generar la fuerza protomotriz utilizada para la fosforilación oxidativa, también participan en mantener el balance redox intracelular y el control de la concentración de O<sub>2</sub>.

El análisis del genoma muestra que *H. pylori* contiene genes involucrados en ambos tipos de respiración. El operón que codifica una NADH-quinona oxidoreductasa (NDH-1), también conocida como complejo I, carece de los genes que codifican a las proteínas NuoE y NuoF involucradas en la unión y la oxidación del NADH y su lugar lo ocupan genes que

codifican polipéptidos de cadena corta que presentan muy poca similitud con otras proteínas. Se ha propuesto que éstos polipéptidos presentan un sitio de unión para proteínas que son capaces de proporcionar electrones al centro FeS de la proteína NuoG. En *H. pylori*, la proteína NuoG contiene un segmento adicional rico en cisteínas que permite la unión a un centro FeS que no es común en las NDH-1 de otros organismos y se ha sugerido que podría sustituir a los centros FeS que necesitan las proteínas donadoras de electrones, haciendo posible el flujo de electrones directamente del residuo de flavina a la proteína NuoG (Finel, 1998). Por otro lado, las NADPH oxidoreductasas pueden ser capaces de alimentar a la cadena de transporte de electrones, lo que sugiere que el complejo NDH-1 es una quinona oxidoreductasa que bombea protones y no una NADH deshidrogenasa (Finel, 1998). En el genoma de *H. pylori* no existen genes que codifiquen un complejo NDH-2, otro tipo de NADH-deshidrogenasa.

Se han identificado otras deshidrogenasas donadoras de electrones en la cadena respiratoria que incluyen a la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, que se encuentra codificada en dos genes distintos que pueden producir una enzima aeróbica y otra anaeróbica, respectivamente; la D-lactato deshidrogenasa y un complejo de hidrogenasa de tipo NiFe que puede actuar como donadora de electrones a la quinona, si el oxígeno está presente y que se encuentra sujeta a activación anaeróbica (Tomb y col., 1997).

*H. pylori* contiene todos los genes que codifican las subunidades típicas de una ubiquinol:citocromo *c* oxidoreductasa, llamada también complejo *bc<sub>1</sub>* o complejo III. El gen que codifica al citocromo *c* es ortólogo al citocromo *c<sub>553</sub>* de *Desulfovibrio vulgaris*. La única oxidasa terminal codificada en el genoma es la citocromo *c* oxidasa tipo *cbb<sub>3</sub>* (Tomb y col., 1997; Alm y col., 1999), lo que concuerda con los resultados experimentales de Nagata y col. (1996), pero que está en desacuerdo con otros autores (Marcelli y col., 1996, Maier y col., 1996) que reportan que los espectros de absorción de la oxidasa terminal son característicos de una citocromo oxidasa tipo *bd*. La subunidad catalítica del citocromo *cbb<sub>3</sub>* presenta un centro binuclear hemo-cobre con alta afinidad por oxígeno, lo cual puede permitir una respiración aeróbica eficiente en un ambiente microaerófilico (García-Horsman y col., 1994). Otras características en la estructura primaria de la citocromo oxidasa *cbb<sub>3</sub>*

indican que pertenece a un grupo separado dentro de la familia de proteínas *cbb*<sub>3</sub> (Smith y col., 2000).

La principal quinona en *H. pylori* es la menaquinona-6 y presenta algunas trazas de menaquinona-4, con ausencia de ubiquinona. Estos tipos de menaquinonas son más comúnmente usadas en la respiración anaeróbica (Goodwin y col., 1986; Moss y col., 1990; Marcelli y col., 1996). La presencia de estas menaquinonas en *H. pylori* permite sugerir que la cadena respiratoria anaeróbica es usada por esta bacteria, y la presencia del citocromo *cbb*<sub>3</sub> permite entender su microaerofilismo.

Algunos datos experimentales sugieren que la fumarato reductasa (mencionada en el ciclo de Krebs) puede actuar como oxidasa terminal (Mendz y col., 1993b; 1995b), y se ha propuesto que la hidrogenasa tipo NiFe y la fumarato reductasa en *H. pylori* pueden ser dos componentes de una cadena respiratoria anaeróbica que utiliza fumarato como aceptor final de electrones (Hazell y col., 1997).

La Fig. 4 presenta un esquema de la membrana plasmática de *H. pylori* para mostrar la localización de los componentes de la cadena respiratoria y de la ATP sintetasa.

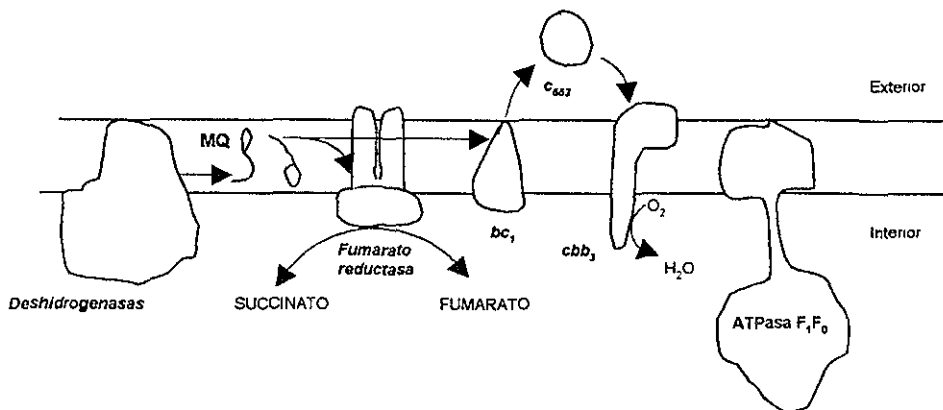


Fig. 4. Esquema de la membrana plasmática de *H. pylori* que muestra la cadena respiratoria y la ATP sintetasa. Las deshidrogenasas incluyen a la NADH-quinona oxidoreductasa (NDH-1), la G-3-P deshidrogenasa, la D-lactato deshidrogenasa y la NiFe-hidrogenasa. Menaquinona-6 (MQ); citocromo c quinol oxidoreductasa (*bc*<sub>1</sub>); citocromo *c*<sub>653</sub>; citocromo c oxidasa (*cbb*<sub>3</sub>).

En el estudio de la cadena respiratoria de *H. pylori* llevado a cabo en el laboratorio (Briones, 2000), se encontró una sensibilidad a rotenona, que aunque pequeña, no había sido reportada y es un punto más a la discusión acerca de la presencia o no del complejo I clásico en la bacteria. Además se encontró una sensibilidad incompleta a antimicina y a cianuro en el consumo de oxígeno.

Para entender completamente la fisiología de este microorganismo microaerófilico, es necesario resolver el enigma de la presencia de una cadena respiratoria aeróbica operativa junto con la respiración anaeróbica a bajas tensiones de oxígeno.

**1.2.4.7. Fosforilación oxidativa.** La fuerza protomotriz que se genera en la cadena respiratoria es utilizada por la ATP sintetasa para producir ATP. La ATP sintetasa bacteriana, una enzima multimérica, está formada por el complejo  $F_0$  que consiste en tres subunidades que forman un canal de protones, y por el complejo  $F_1$  que está formado por cinco subunidades que constituyen el sitio catalítico. En *E. coli*, las ocho subunidades se encuentran codificadas en el operón *atp*. En *H. pylori*, las cinco subunidades del complejo  $F_1$  y la subunidad b del complejo  $F_0$  están contiguas en el cromosoma. Las otras dos subunidades del complejo  $F_0$  están codificadas por genes que se encuentran en otra región del cromosoma. *H. pylori* tiene una subunidad adicional que es homóloga a la b', la cual es una forma divergente y duplicada de la subunidad b, que se encuentra en plantas y bacterias fotosintéticas. El gen que codifica esta subunidad se encuentra localizado al final del grupo de genes de la ATP sintetasa (Doig y col., 1999).

La capacidad de *H. pylori* de generar un gradiente iónico a través de la membrana plasmática a pH bajo ha sido estudiada por Matin y col. (1996), indicando que la bacteria en un medio ácido tiene la capacidad de cambiar la polaridad de la membrana, estableciendo un potencial positivo en el interior que la provee de una barrera eléctrica para evitar la entrada de protones. Un interior celular positivo puede ser creado por transporte activo de aniones o por difusión de protones, siendo este último mecanismo el más probable, debido a que no es claro un mecanismo de eflujo electrógeno de aniones en el análisis del genoma (Tomb y col., 1997). Se ha sugerido que las ATPasas tipo-P pudieran llevar a cabo la salida de protones, pero esto no ha sido apoyado por la identificación de las ATPasas



tipo-P en el genoma, cuyas secuencias se encuentran más relacionadas con transportadores de cationes divalentes (Melchers y col., 1996; Tomb y col., 1997).

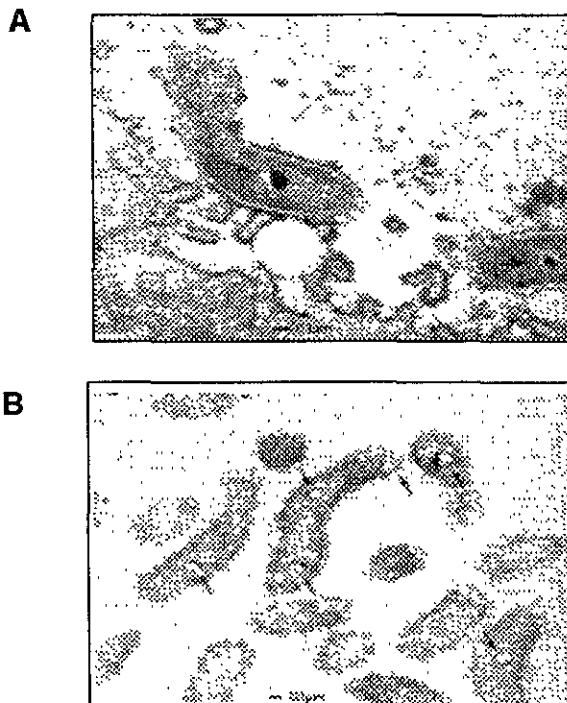
**1.2.4.8. ATPasas tipo P.** En *H. pylori* se han identificado tres ATPasas translocadoras de protones tipo P. Dos de ellas se han clonado y caracterizado parcialmente (Ge y col., 1995; Melchers y col., 1996). Una se encuentra relacionada con el transporte de cobre, otra con el suministro de níquel, un componente esencial en la actividad de la ureasa y relacionada con el transporte de cadmio (Melchers y col., 1996) y la tercera parece estar relacionada con el transporte de cationes divalentes (Tomb y col., 1997). Inicialmente se pensó que estas ATPasas tipo P jugaban un papel importante en la regulación del pH intracelular a través de la salida de protones (Melchers y col., 1996), pero estudios posteriores han demostrado que estas ATPasas están más estrechamente relacionadas con proteínas transportadoras de cationes divalentes que se encuentran involucradas en la incorporación de cationes divalentes y la eliminación de metales tóxicos (Marais y col., 1999).

**1.2.4.9. Pirofosfato y polifosfatos.** La principal fuente de energía en *H. pylori*, como en los demás organismos vivos, es el ATP, pero existen otras moléculas que contienen enlaces de alta energía, como el pirofosfato (PPi) y los polifosfatos (Kornberg, 1995; Lahti, 1983), que también pueden ser utilizadas como fuente de energía y que hasta el momento no se ha evaluado el papel que desempeñan en este microorganismo.

Los polifosfatos se encuentran en todos los organismos vivos, desde bacterias hasta mamíferos (Kulaev, 1979; Wood, 1987; Wood y col., 1988; Kornberg, 1995), y se les han atribuido diversas funciones biológicas dependiendo de la especie, de las necesidades de la célula y de su localización subcelular.

Dentro de las funciones atribuidas a los polifosfatos se encuentran las siguientes: **1)** fuente de energía en la síntesis de ATP (Kornberg, 1957; Ahn y col., 1990; Bonting y col., 1991); **2)** sustituyente del ATP en la fosforilación de la glucosa (Hsieh y col., 1993) y de algunas proteínas (Skorko, 1989); **3)** reserva de Pi (Akiyama y col., 1993; Andreeva y col., 1993; Keasling y col., 1993; Wurst y col., 1994); **4)** ventaja osmótica sobre el Pi, debido a

que como polímero ofrece baja solubilidad en agua (Wood y col., 1988; Kornberg, 1995); **5)** quelante de cationes divalentes (Archibald y col., 1982; Dunn y col., 1994); **6)** amortiguador intracelular de iones alcalinos en algunos microorganismos (Pick y col., 1991); **7)** elemento estructural junto con el polihidroxitirato y el  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana de células competentes para la transformación bacteriana (Reusch y col., 1988; Reusch y col., 1995); **8)** regulador del desarrollo celular debido a que se ha encontrado que el polifosfato y las actividades enzimáticas involucradas en su metabolismo se modifican durante los cambios en el desarrollo de algunos microorganismos en respuesta a la deficiencia de uno o varios nutrientes (Voelz y col., 1966); **9)** componente de la cápsula bacteriana que podría contribuir en la patogénesis de la infección debido a que más del 50% del polifosfato total de las especies de *Neisseria* se localiza en este sitio (Tinsley y col., 1993; Lee y col., 1994).



**Fig. 5. Polifosfatos en *Helicobacter pylori*.** **A)** *H. pylori* asociado a células de la mucosa gástrica. **B)** Cultivo de *H. pylori* aislado de tejido gástrico mostrado en A. Los gránulos de polifosfato se señalan con las flechas. (Micrografías electrónicas tomadas de Bode y col., 1993.)

A través de microscopía electrónica se ha demostrado que *H. pylori* contiene múltiples agregados de polifosfato localizados en diferentes partes de la célula (Bode y col., 1993) (Fig. 5). La acumulación más importante de gránulos de polifosfato que se observa en este microorganismo es a nivel intracitoplásmico, los cuales pueden representar un reservorio para el almacenamiento energético y de fósforo, y una fuente alternativa de energía cuando el ATP se encuentra en niveles bajos (Dawnes y col., 1973). Otros sitios en los que se observa la acumulación de polifosfatos es cerca de la base del flagelo y pequeños agregados asociados a la membrana celular. El depósito cercano al flagelo podría estar relacionado con la fuente de energía para la motilidad bacteriana (Berg y col., 1979) y los agregados asociados a la membrana podrían estar relacionados con el mantenimiento de la integridad de la membrana citoplásmica (Skorko, 1989). Sin embargo, la importancia y el metabolismo de estas moléculas en *H. pylori* aún no ha sido estudiado.

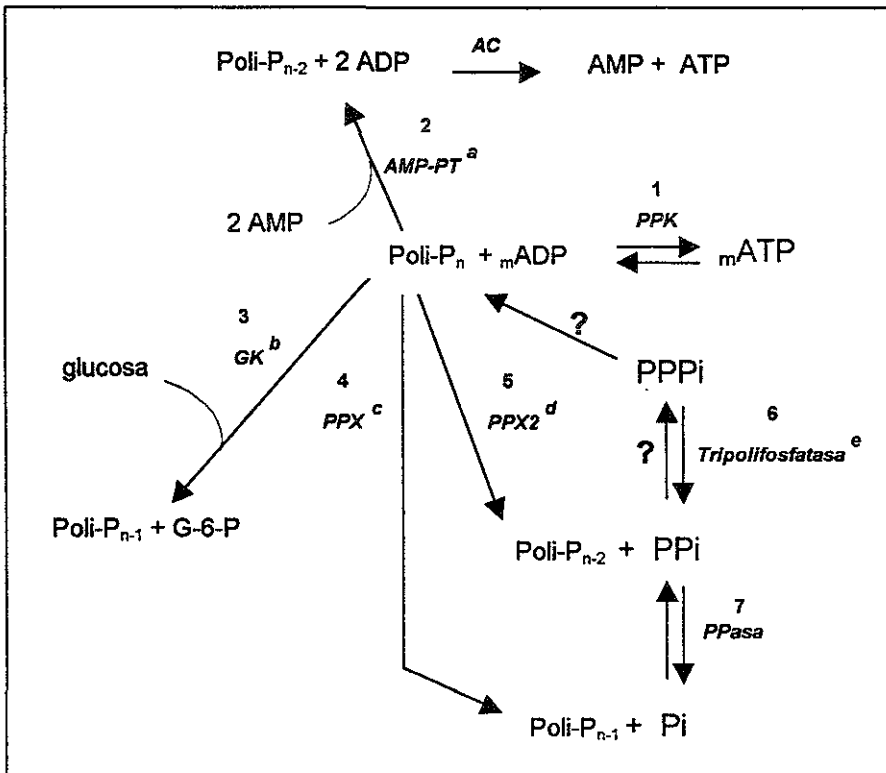
El estudio del metabolismo de los polifosfatos en organismos procariontes y eucariontes ha permitido establecer que la única vía para su síntesis es la polimerización del fosfato terminal del ATP a través de la polifosfato cinasa (PPK) (EC 2.7.4.1) (Ahn y col., 1990; Robinson y col., 1987; Tinsley y col., 1993; Kulaev y col., 1987). La misma PPK puede sintetizar ATP mediante la reacción en reversa (Kornberg, 1957; Ahn y col., 1990). Se ha encontrado que los polifosfatos pueden ser utilizados como sustrato para la síntesis indirecta de ATP a través de la acción concertada de una AMP-fosfotransferasa (AMP-PT) y de la adenil cinasa (AC) (Bonting y col., 1991). Los polifosfatos pueden sustituir al ATP en la fosforilación de la glucosa a través de una polifosfato glucocinasa (GK) (Hsieh y col., 1993) y en la fosforilación de algunas proteínas (Skorko, 1989). Los polifosfatos de alto peso molecular pueden ser reserva de Pi al ser hidrolizados a través de las exopolifosfatasas (PPX). Se han identificado dos tipos de PPX, una que hidroliza al polifosfato terminal para producir Pi (Akiyama y col., 1993; Keasling y col., 1993; Andreeva y col., 1993; Wurst y col., 1994) y otra para producir PPI ( Loreny y col., 1995) (Fig. 6).

Para la síntesis de polifosfato en *E. coli* se requiere que exista una cadena de tetrapolifosfato, que sirva como cebador para la elongación de la cadena (Ahn y col., 1990) y hasta el momento no se ha encontrado una tetrapolifosfato cinasa para su síntesis. En los géneros *Aspergillus*, *Neurospora*, *Escherichia* y *Saccharomyces*, se ha identificado una

actividad de tripolifosfatasa (Kulaev, 1979), pero su capacidad para llevar a cabo la reacción en reversa no ha sido estudiada (Fig. 6).

Tomando en cuenta a las enzimas involucradas en el metabolismo de los polifosfatos que se han encontrado en diferentes organismos, elaboramos un esquema que incluye a todas estas enzimas (Fig. 6), con el propósito de tener un panorama general del metabolismo de los polifosfatos y buscar las actividades enzimáticas en *H. pylori*, como parte del proyecto general del laboratorio para estudiar las fuentes y reserva de energía en este microorganismo. Es importante señalar que las actividades de las enzimas antes mencionadas no están presentes en todos los organismos.

El análisis del genoma de *H. pylori* (Tomb y col., 1997; Alm y col., 1999) ha mostrado que de las enzimas involucradas en el metabolismo de los polifosfatos, señaladas en el esquema de la Fig. 6, solo se han identificado los genes de la polifosfato cinasa (PPK) y de la glucocinasa (GK), así como también el gen de la PPasa. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que las otras enzimas involucradas en el metabolismo de los polifosfatos no estén presentes, debido a que como se mencionó previamente, aun queda el 40% del genoma de *H. pylori* al que no se le ha asignado una función.



**Fig. 6. Esquema general del metabolismo de los polifosfatos tomando en cuenta a las enzimas encontradas en diferentes organismos. Los detalles se describen en el texto..Polifosfato cinasa (PPK) (1). AMP fosfotransferasa (AMP-PT) (2). Adenil cinasa (AC). Polifosfato glucocinasa (GK) (3). Exopolifosfatasas (PPX1, PPX2) (4,5). Tripolifosfatasa (6). Pirofosfatasa (PPasa) (7). Las actividades enzimáticas no están presentes en todos los organismos. La letra supraíndice colocada en algunas enzimas indica el organismo en donde se ha encontrado su actividad.**

<sup>a</sup> *Acinetobacter* (Bonting y col., 1991).

<sup>b</sup> *Mycobacterium tuberculosis* (Hsieh y col., 1993).

<sup>c</sup> *E. coli* (Akiyama y col., 1993; Kaesling y col., 1993), *S. cerevisiae* (Andreeva y col., 1993; Wurst y col., 1994), *T. lyncunum* (Loreny y col., 1995).

<sup>d</sup> *T. lyncunum* (Loreny y col., 1995).

<sup>e</sup> *Aspergillus*, *Neurospora*, *Escherichia*, *Saccharomyces* (Kulaev, 1979).

**1.2.4.10. El PPI y las pirofosfatasas.** El PPI es el compuesto mas sencillo que contiene un enlace fosfoanhidro, este enlace es la forma química básica por la cual se transmite la energía en las células. El PPI se sintetiza como producto metabólico de diversas reacciones biosintéticas (síntesis de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, urea, lípidos) (Kornberg, 1957; Lahti, 1983). La energía libre de hidrólisis ( $\Delta G^\circ$ ) del PPI en ausencia de  $Mg^{2+}$ , es de  $-5.7 \text{ Kcal mol}^{-1}$ , muy cercana a la del enlace gama del fosfato del ATP, y en presencia de  $Mg^{2+}$ , el  $\Delta G^\circ$  es igual a  $-4 \text{ Kcal mol}^{-1}$  (Martell y col., 1971). Sin embargo, el  $\Delta G^\circ$  de hidrólisis del PPI varía considerablemente dependiendo del pH y de la concentración del catión divalente en el medio de reacción (De Meis, 1984).

La concentración de PPI intracelular en diferentes organismos (bacterias, animales y plantas) se encuentra entre 0.1 y 2 mM (Baltscheffsky y col., 1984). En el caso de la arqueobacteria *Methanobacterium thermoautotrophicum* la concentración de PPI intracelular varía de 2.5 a 40 mM de acuerdo a las condiciones de cultivo (Keltjens y col., 1988). Como puede observarse, la concentración de PPI es comparable con la concentración de ATP en diferentes organismos, que varía de 2 a 10 mM (Matthews y col., 1982; Zweier y col., 1987).

Diversos trabajos han demostrado que en varias reacciones enzimáticas de diferentes microorganismos, el PPI puede sustituir al ATP como fuente de energía (Sui y col., 1962; Evans y col., 1968; Hatch y col., 1968; Reeves, 1968; Mansurova y col., 1975; Baltscheffsky y col., 1966), o que son dependientes de PPI (Lawson y col., 1979; Edwards y col., 1985).

La pirofosfatasa (PPasa) [E.C.3.6.1.1.] es la enzima que se encarga de hidrolizar el PPI a Pi. Existen dos tipos de PPasas, las citoplásmicas y las membranales. Las PPasas citoplásmicas se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos vivos (Lahti, 1983) y tienen la función de hidrolizar el PPI sintetizado durante las reacciones biosintéticas para favorecer termodinámicamente estas reacciones anabólicas (Kornberg, 1957). Las PPasas membranales se encuentran en algunas bacterias fotosintéticas (Baltscheffsky, 1978), en la membrana interna mitocondrial (Mansurova, 1989) y en el tonoplasto de las plantas (Rea y col., 1992). Estas PPasas membranales llevan a cabo la misma función de hidrólisis de PPI, pero acoplada al transporte de  $H^+$ , estableciendo gradientes iónicos

transmembranales. En el caso de las PPasas membranales bacterianas, éstas también pueden llevar a cabo la síntesis de PPI (Baltscheffsky, 1978).

El papel que juega la PPasa en el metabolismo energético de *H. pylori* no ha sido estudiado, por lo que consideramos que localizar, purificar y caracterizar a las PPasas en este microorganismo es importante para entender si éstas enzimas participan en mecanismos transductores de energía.

---

## II. OBJETIVOS

### II.1. Objetivo general.

Definir el o los mecanismos de utilización del enlace fosfato de alta energía contenido en el pirofosfato en *Helicobacter pylori*.

### II.2. Objetivos particulares.

- 1) Determinar la actividad de las pirofosfatasas, tanto en la fracción soluble y en la membranal para definir su localización.
- 2) Purificar a las pirofosfatasas detectadas.
- 3) Caracterizar cinética y estructuralmente a las pirofosfatasas.
- 4) Tratar de establecer si el pirofosfato y las enzimas involucradas en su metabolismo tienen alguna participación en la capacidad de transducción de energía en la bacteria.



### III. MATERIALES Y METODOS

#### III.1. Materiales.

Todos los reactivos químicos empleados en este trabajo fueron de alto grado de pureza, disponibles comercialmente. Las pirofosfatasa (PPasas) inorgánicas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* fueron obtenidas de SIGMA Chemicals (St. Louis, MO, USA).

#### III.2. Métodos.

**III.2.1. Cultivo de bacterias.** La cepa 8823 (ATCC 49503) de *Helicobacter pylori* fue amablemente donada por el Dr. Martin Blaser de la Escuela de Medicina de la Universidad de Vanderbilt, Nashville, Tennessee. Las bacterias se cultivaron en cajas de agar-sangre (agar de soya tripsinizada marca DIFCO con 10% de sangre desfibrinada de carnero) en presencia de vancomicina 6 µg/ml en una atmósfera microaeróbica (CO<sub>2</sub> 10% v/v) durante 48 h a 37 °C. Para cultivos líquidos a gran escala, el material obtenido de una caja se utilizó para inocular 30 ml de caldo Brucella broth (BBL Becton Dickinson Microbiology Systems, EUA) que contenía suplemento selectivo para *H. pylori* (OXOID SR147E) y suero fetal bovino al 10% en un tubo Falcon. El cultivo se mantuvo a 37 °C en agitación suave (150 rpm) y se cosechó a las 48 h por centrifugación (1100 x g por 10 min). A la pastilla obtenida se le realizaron pruebas de actividad de ureasa, catalasa y oxidasa, y se tomó una muestra para tinción con Gram para comprobar sus características morfológicas y de tinción. La pastilla obtenida se utilizó para inocular 100 ml de caldo Brucella broth con suero fetal bovino al 10% en un matraz Erlenmeyer, manteniendo el cultivo a 37 °C en agitación suave durante 48 h.

**III.2.2. Pruebas de identificación de *H. pylori*.** La actividad de ureasa se realizó agregando una muestra de bacterias (tomada con el asa de cultivo) a 300 µl de una solución de urea 6 M, pH 7.2 y rojo de fenol al 0.05% como indicador de pH (6.8-

8.2, amarillo-rojo). Cuando la actividad de ureasa es positiva, el color de la solución cambia de rosáceo a rojo.

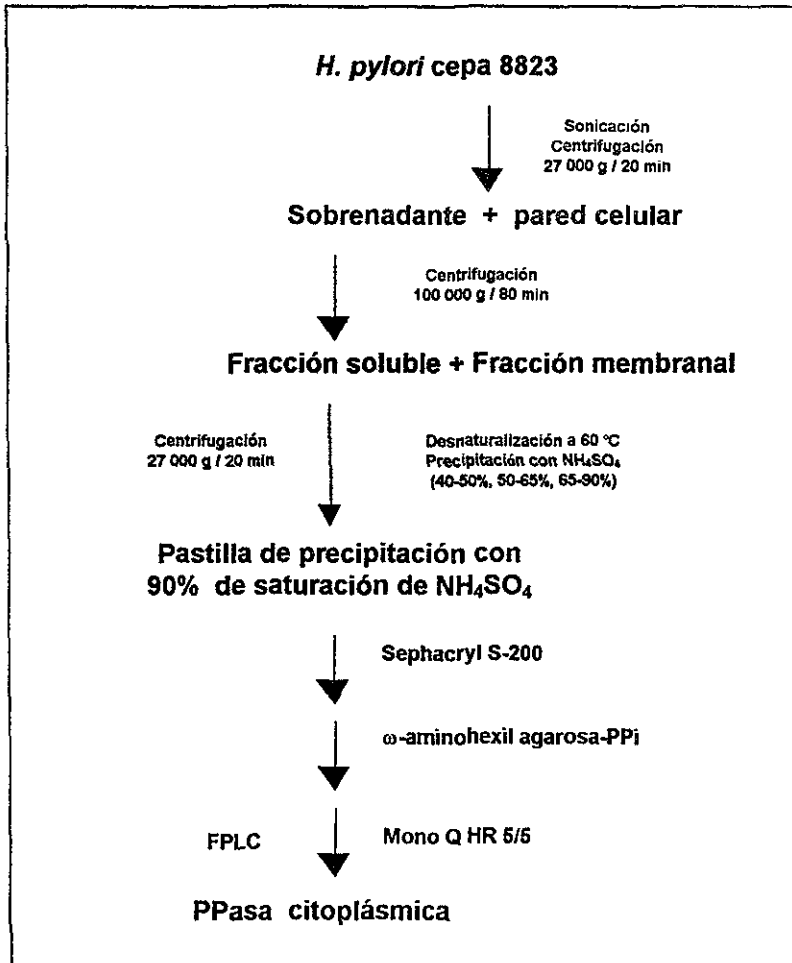
Para determinar la actividad de catalasa, una muestra de bacterias se agregó a 200  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 30%. La prueba es positiva al producirse burbujeo inmediatamente.

La actividad de oxidasa se llevó a cabo en una placa de Dry Slide Oxidase (Difco), colocando una muestra de bacterias. La prueba es positiva cuando la placa cambia a color azul.

**III.2.3. Fraccionamiento celular.** Después de cosechar las bacterias por centrifugación (11,000 x g durante 10 min a 4°C), estas se lavaron dos veces por centrifugación (27 000 x g por 20 min) en una solución que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8.6 y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Las células se resuspendieron en la misma solución (1/6 w/v) con 200 unidades de DNasa/50 ml de solución y se sonicaron en alícuotas de 15 ml durante 3 min en hielo, utilizando un sonicador de vástago Branson 250. Después de centrifugar a 27 000 x g por 20 min a 4 °C, el sobrenadante que se obtuvo se centrifugó a 100 000 x g durante 80 min a 4 °C. La pastilla que contenía la fracción membranal se resuspendió en Tris-HCl 20 mM, pH 8.6 y MgCl<sub>2</sub> 1 mM. Las actividades de ATPasa y PPasa se determinaron en la fracción membranal y la actividad de PPasa citoplásmica en el sobrenadante que se denominó fracción soluble.

**III.2.4. Purificación parcial de la PPasa citoplásmica.** La purificación parcial de la PPasa citoplásmica de *H. pylori* se llevó a cabo modificando el método de Klemme y Gest (1971), en dónde no se incluyó el paso de sulfato de protamina y la precipitación con sulfato de amonio se incrementó hasta 90% de saturación con la sal. A la fracción soluble obtenida por el método descrito previamente en III.2.3., se le ajustó el pH a 8.6 y posteriormente se calentó a 60 °C durante 5 minutos en alícuotas de 15 ml. Inmediatamente después del calentamiento, las alícuotas se enfriaron en hielo hasta alcanzar los 4 °C y se centrifugaron a 27 000 x g durante 20 min. El

sobrenadante obtenido se sometió a fraccionamiento por precipitación con sulfato de amonio a 40, 50, 65 y 90% de saturación con esta sal, agitando suavemente durante 5 minutos en cada precipitación y centrifugando a 27 000 x g por 20 min después de cada precipitación. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C, excepto la cromatografía en columna de Mono Q, que se realizó a temperatura ambiente. Después del fraccionamiento con sulfato de amonio, el sobrenadante obtenido de la precipitación con 90% de saturación de la sal, se dializó durante toda la noche contra una solución A que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8.5 a 4°C y posteriormente se cargó en una columna de Sephacryl S-200 (1.5 x 70 cm) equilibrada y eluída con solución A. Se tomaron fracciones de aproximadamente 0.55 ml y las fracciones que presentaron mayor actividad de PPasa se juntaron y se aplicaron a una columna de afinidad-intercambio iónico de  $\omega$ -aminohexilagarosa-PPi (3 x 17 cm), equilibrada con solución A. Después de cargar la muestra, la columna se lavó con 200 ml de solución A + PPINa 100 mM y nuevamente con 200 ml de solución A. La enzima se eluyó con un gradiente lineal de 0-1.2 M de NaCl en solución A y se colectaron fracciones de aproximadamente 0.5 ml. Las fracciones con mayor actividad de PPasa se juntaron, se dializaron contra cinco litros de solución A y se concentraron en Centricon 10, antes de aplicarse al FPLC en una columna de Mono Q HR 5/5 de intercambio aniónico (Pharmacia), equilibrada con solución A. La columna se lavó con 15 volúmenes de la misma solución y posteriormente se eluyó con 60 ml de un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl en solución A., con una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Se colectaron fracciones de 0.5 ml y las fracciones activas se juntaron y dializaron durante toda la noche en solución A + MgCl<sub>2</sub> 1 mM. Cuando la preparación no se utilizó inmediatamente, se guardó a -20 °C. En cada fracción obtenida de las cromatografías en columna, se determinó la concentración de proteína a 280 nm y la actividad hidrolítica colorimétricamente a 700 nm, según el método descrito por Sumner (1944). La Figura 7 muestra el diagrama de flujo de este procedimiento.



**Fig.7. Diagrama de flujo. Esquema de fraccionamiento celular y purificación parcial de la PPasa citoplásmica de *H. pylori*.** Por medio de sonicación y centrifugación diferencial se obtuvo la fracción soluble que se sometió a calentamiento a 60 °C y precipitación con sulfato de amonio (40-50%, 50-65% y 65-90% de saturación). Después de dializar la pastilla, el proceso de purificación se llevó a cabo por medio de cromatografía en columnas de Sephacryl S-200,  $\omega$ -aminohexil agarosa-PPi y Mono Q. Todo el procedimiento se realizó a 4 °C, excepto el último paso de la cromatografía por FPLC. Los detalles se describen en la sección de Métodos.

**III.2.5. Determinación de actividad de PPasa y ATPasa.** La actividad enzimática se determinó cuantificando el Pi liberado en la reacción hidrolítica. El medio de ensayo contenía: para la hidrólisis de PPi, Tris-maleato 50 mM, pH 7.5 (para la actividad membranal) o pH 8.5 (para la actividad citoplásmica), NaPPi 2 mM y MgCl<sub>2</sub> 3 mM; para la hidrólisis de ATP, Tris-acetato 50 mM, pH 8, ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, fosfoenolpiruvato 1.45 μM y piruvato cinasa 7 μg. La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 37 °C utilizando 100 μg de proteína membranal o 10 μg de proteína citoplásmica en un volumen final de 0.5 ml. La reacción se detuvo con TCA a una concentración final de 6%. Las modificaciones a estas condiciones de ensayo se indican en los pies de figura. El Pi liberado en el sobrenadante se determinó por el método de Sumner (1944) o por el método de Ames (1966), este último con mayor sensibilidad (hasta 0.01 μmol de Pi) y se utilizó para medir la actividad hidrolítica en las velocidades iniciales de la reacción y poder obtener los parámetros cinéticos derivados de la ecuación de Michaelis-Menten.

Las concentraciones libres de iones metálicos, ligandos y complejos metal-ligando se calcularon a través del programa de cómputo de Fabiato (1988). Las constantes de asociación ( $K_a$ ) se tomaron de la publicación de Martell y Sillén (1971).

**III.2.6. Determinación de proteína.** La proteína se determinó por el método de Lowry y col. (1951) usando albúmina sérica bovina como estándar.

**III.2.7. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida y actividad en gel.** La PPasa citoplásmica se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes por el método de Davis (1964). Para localizar la actividad *in situ* de la PPasa, los geles se trataron como describen Romero y col. (1991).

**III.2.8. Análisis de las formas isoméricas de la PPasa por electroforesis.** La electroforesis en placas de geles nativos se llevó a cabo como describe Davis (1964),

excepto que la relación de N,N'-metilenbisacrilamida (Bis) y acrilamida fue de 1:30. El análisis de las formas isoméricas de la PPasa se realizó siguiendo el método de Hedrick y Smith (1968) y consistió en emplear un grupo de seis geles con concentraciones Bis/acrilamida entre 6 y 11%, utilizando 4  $\mu\text{g}$  de proteína de las PPasas de *H. pylori* y *E. coli*, así como de los marcadores de peso molecular. Las proteínas estándares que se utilizaron fueron:  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y BSA (monómero 66 kDa y dímero 132 kDa). Después de la electroforesis, los carriles de las PPasas se tiñeron por actividad (Romero y col., 1991) y posteriormente todo el gel se tiñó con plata (Oakley y col., 1980). En cada gel se determinó la movilidad relativa ( $R_f$ ) de cada proteína y se construyeron gráficas de Ferguson (1964), que correlacionan el logaritmo de  $R_f$  versus el porcentaje de la concentración Bis/acrilamida del gel para cada proteína. En este tipo de gráficas, los isómeros de peso molecular producen una familia de líneas no paralelas que intersectan a una concentración del gel entre 2 y 3%, y los isómeros de carga dan una familia de líneas paralelas (Hedrick y Smith, 1968). Las pendientes o coeficientes de retardo ( $K_R$ ) de cada una de las líneas en las gráficas de Ferguson se obtuvieron a través del análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados. La relación entre el logaritmo de la pendiente negativa y el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándares se utilizó para determinar el peso molecular de los isómeros de las PPasas.

**III.2.9. Electroforesis en geles bidimensionales.** En la primera dimensión, las proteínas se separaron por electroforesis en geles nativos de poli(acrilamida) al 12%. Para la segunda dimensión, los carriles del gel nativo se cortaron y se incubaron en una solución de Tris-HCl 20 mM, pH 6.8 y  $\beta$ -mercaptoetanol al 1% durante 5 min. Los carriles se sometieron a electroforesis en geles de poli(acrilamida) al 16% en presencia de SDS al 1% como describen Schagger y col. (1986). La masa molecular de las subunidades se determinó en una gráfica tomando los valores de los logaritmos de  $R_f$  de las proteínas estándares versus su peso molecular. Los geles se tiñeron con plata

siguiendo el método de Oakley y col. (1980).

**III.2.10. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.** Se hizo directamente a las fracciones activas obtenidas de las cromatografías en columna, y se llevó a cabo en presencia de SDS al 1% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 10% como describe Laemmli (1970).

**III.2.11. Determinación de la masa molecular de la PPasa nativa por filtración en gel.** El peso molecular de la PPasa nativa se obtuvo por cromatografía en filtración por gel utilizando una columna de Sephacryl S-300 (1 x 47.5 cm). Una muestra de la PPasa (120  $\mu$ g de proteína) y las proteínas de calibración se aplicaron a la columna previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 8.5 y  $MgCl_2$  1 mM. La elución se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 0.2 ml/min y se colectaron fracciones de 0.5 ml. A cada fracción se le determinó la absorbencia a 280 nm y se probó para actividad de PPasa. La masa molecular de la enzima se determinó en una gráfica relacionando el coeficiente de partición ( $V_e/V_o$ ) de las proteínas de calibración y el logaritmo de su peso molecular, como describe Whitaker (1963). Las proteínas de calibración utilizadas fueron: ferritina (440 kDa), PPasa de levadura (66 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

**III.2.12. Análisis de la secuencia N-terminal.** Después de la electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida de la PPasa obtenida de la columna de Mono Q, las proteínas se transfirieron a una membrana ProBlott a 400 mA durante 2.5 h a 4°C en presencia de CAPS 10 mM, pH 11 y metanol al 10%, siguiendo el procedimiento de Matsudaira (1987). La membrana se tiñó con azul de Coomassie R para localizar la banda de la PPasa, la cual se cortó y se mandó secuenciar al Laboratoire de Microséquençage des Protéins, Institute Pasteur, Paris, Francia, en un Secuenciador 473 A (Applied Biosystems) por el Dr. J. d' Alayer.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

**IV.1. Localización intracelular de la PPasa en *Helicobacter pylori*.** La PPasa en las bacterias es una enzima que se localiza generalmente en el citoplasma; sin embargo, en algunas bacterias fotosintéticas como *Rhodospirillum rubrum*, la actividad de PPasa se localiza tanto en el citosol como en la membrana plasmática. Con el propósito de localizar la actividad de la PPasa en las células de *H. pylori*, las membranas del extracto crudo se separaron de la fracción soluble a través de centrifugación diferencial. A ambas fracciones (membranal y soluble), se les determinó la actividad de PPasa y de ATPasa. La actividad de PPasa en la fracción membranal ( $0.07 \mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) fue baja y presentó un 88% de inhibición con molibdato de sodio 5 mM, un inhibidor de fosfatasa, indicando que probablemente en ésta fracción se encuentran las enzimas que contribuyen a la actividad obtenida. En el estudio de la ATPasa  $F_1-F_0$  de *H. pylori* (Briones, 2000), se corroboró la presencia de fosfatasa en la fracción membranal. En la fracción soluble la actividad de PPasa fue de  $1.52 \mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, sensible 100% a NaF 10 mM (inhibidor clásico de las PPasas) y no presentó inhibición con molibdato de sodio. La actividad de ATPasa ( $0.11 \mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) solamente se observó en la fracción membranal. La Tabla 1 muestra los resultados de la actividad de la PPasa y de la ATPasa en las fracciones membranal y soluble.

Actividad	Fracción	
	Membranal	Soluble
	$\mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	
PPasa	0.07	1.52
ATPasa	0.11	0

Tabla 1. Actividad de la PPasa y ATPasa de la fracción membranal y soluble de *H. pylori*.



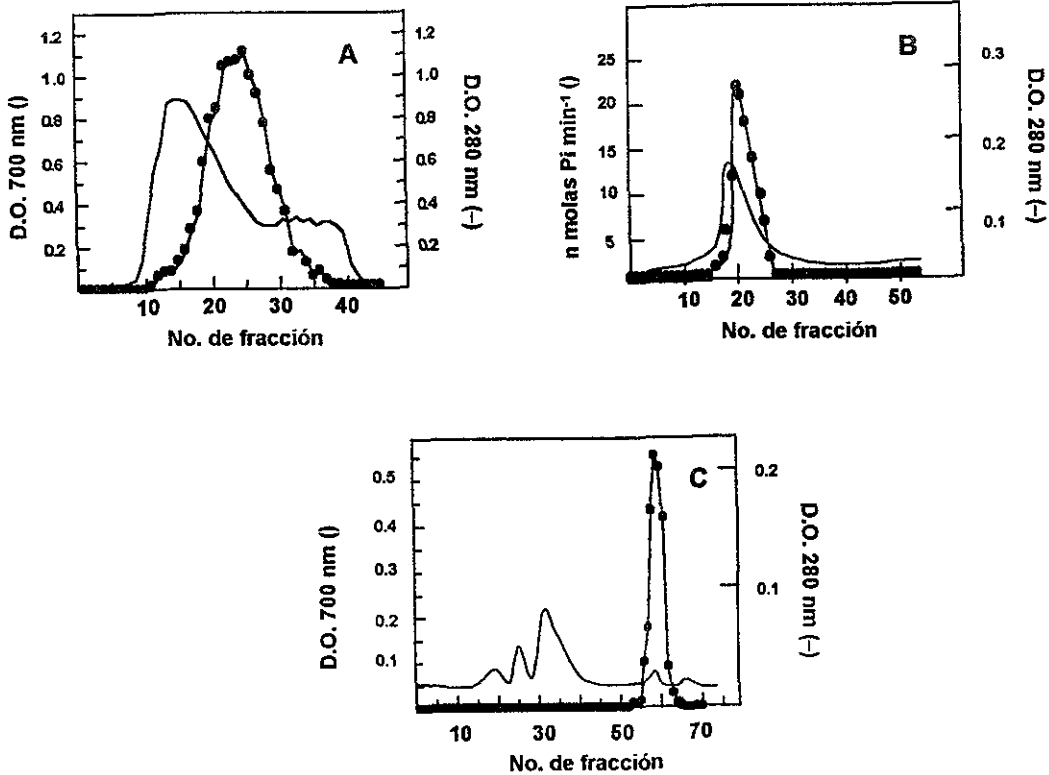
Estos resultados indican que la mayor actividad de la PPasa se localiza en el citosol y probablemente su función, como la de las otras PPasas citoplásmicas, es mantener baja la concentración de PPi dentro de la célula (Lahti, 1983). Al no estar presente en la membrana plasmática, no participa en mecanismos de transducción de energía. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que la enzima, a través de la hidrólisis de PPi, provea de energía para llevar a cabo algunas vías biosintéticas. Por otro lado, no se encontró una secuencia homóloga al gen de la PPasa membranaral de *Rhodospirillum rubrum* (P ID: gi7212770) en el genoma de *H. pylori* a través de BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)), por lo que es poco probable que *H. pylori* presente una PPasa membranaral.

**IV.2. Purificación parcial de la PPasa citoplásmica de *H. pylori*.** El conocer que la PPasa se localiza en el citosol nos permitió desarrollar el proceso de su purificación, descrito en la sección de Métodos. Los resultados típicos de la cromatografía se presentan a continuación. Después del fraccionamiento con sulfato de amonio, la muestra se dializó contra una solución que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8.5 y se aplicó a una columna de Sephacryl S-200. El perfil de elución de esta columna se muestra en la Figura 8A. Las fracciones con mayor actividad enzimática que correspondieron al volumen de elución de 49 hasta 55 ml, contenían 4.8 mg de proteína total, con una actividad específica de  $8.7 \mu\text{molas de Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína. La proteína obtenida se cargó en una columna de  $\omega$ -aminohexilagarosa-PPi y su perfil de elución con un gradiente lineal de 0 a 1.2 M de NaCl se muestra en la Figura 8B. Las fracciones con mayor actividad de PPasa se eluyeron a una conductancia de 24 a 36 mS [esta determinación se realizó con un conductímetro CDM3 Radiometer (Copenhagen), con una microcelda apropiada], y correspondieron a las fracciones 18 a 24 de la elución, con una actividad específica de  $33.1 \mu\text{molas de Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína. Estas fracciones se dializaron y concentraron antes de aplicarse a una columna de Mono Q HR 5/5 para FPLC. En este último paso de purificación, las fracciones con mayor actividad enzimática (Fig. 8C), se eluyeron cerca de 0.5 M del gradiente de NaCl. La actividad de la PPasa por este procedimiento se purificó 82

veces, con una actividad específica de  $141.7 \mu\text{molas Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína. En levadura, la actividad enzimática se ha purificado 78 veces (Cooperman y col., 1973), en *E. coli* de 1100 a 1800 veces (Wong y col., 1970; Jones, 1966), en *Thiobacillus thiooxidans* 800 veces (Tominaga y col., 1977) y en *R. rubrum* 342 veces (datos del laboratorio).

Es importante señalar que las muestras que se aplicaron a las columnas de Sephacryl S-200, de  $\omega$ -aminohexilagarosa-PPi y de Mono Q no contenían  $\text{MgCl}_2$ , por lo que después de la elución de la última columna, se añadió  $\text{MgCl}_2$  a una concentración final de 1 mM, debido a que la enzima pierde dos tercios de su actividad después de almacenarse a  $-20^\circ\text{C}$  durante 2 semanas sin cationes divalentes. Cuando se añade  $\text{Mg}^{2+}$ , la enzima puede almacenarse a  $-20^\circ\text{C}$  por varios meses sin pérdida significativa de su actividad.

La Tabla 2 presenta el resumen de los resultados de una purificación parcial típica de la PPasa soluble de *H. pylori*.

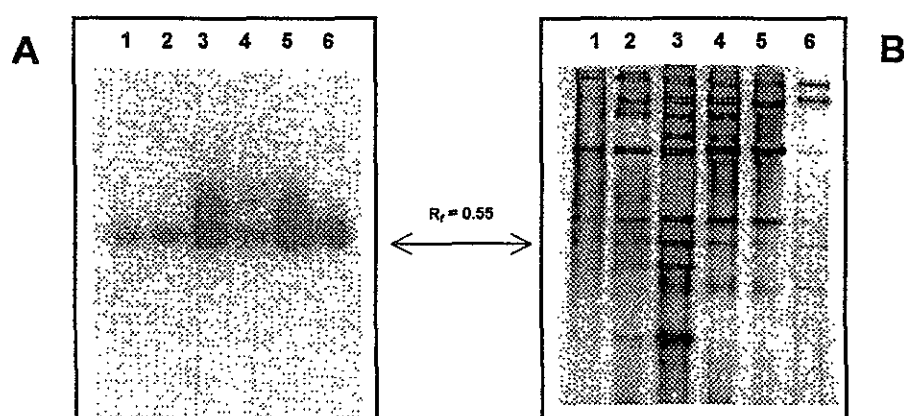


**Fig.8.** Perfiles típicos de las cromatografías empleadas en la purificación de la PPasa de *H. pylori*. La concentración de proteína se cuantificó por absorbencia a 280 nm (-) y la actividad hidrolítica a 700 nm (•). Cromatografía en columna de: **A)** Sephacryl S-200, **B)**  $\omega$ -aminohexilagarosa-PPi y **C)** Mono Q HR 5/5. El proceso de purificación se realizó al menos 7 veces y el procedimiento se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Paso de purificación	Volumen total ml	Proteína total mg	Actividad específica $\mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	Actividad total $\mu\text{mol Pi}$	Veces de purificación	Rendimiento %
Extracto crudo	150	96.2	1.71	164.5		100
Sobrenadante de la desnaturalización a 60°C	140	53.5	2.09	111.8	1.2	55.6
Fración de sulfato de amonio (90% de saturación)	13	14.0	5.89	82.46	3.5	14.5
Sephacryl S-200	7.0	4.80	8.70	41.76	5.0	4.9
$\omega$ -aminohexil agarosa-PPi	3.2	0.63	33.1	20.85	19.3	0.65
Mono Q HR 5/5	1.96	0.24	141.7	34.0	82.8	0.24

Tabla 2. Purificación de la PPasa de *H. pylori*. El procedimiento se describe en la sección de Materiales y Métodos

La presencia de la PPasa en las fracciones obtenidas a través del procedimiento de purificación se siguió tanto por su actividad hidrolítica (Fig. 8) como por electroforesis en geles nativos teñidos por actividad para determinar su movilidad relativa ( $R_f$ ), como se muestra en la Figura 9A. Posteriormente, los geles se tiñeron con plata (Fig. 9B) para analizar el contenido proteico de las fracciones obtenidas de las cromatografías.



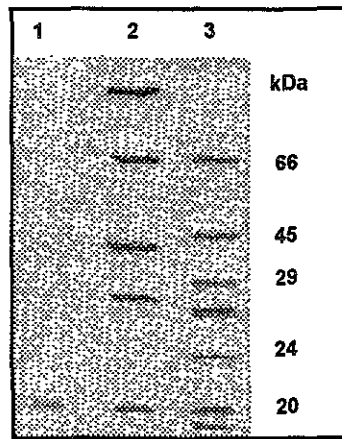
**Fig. 9. Electroforesis de las fracciones obtenidas por el procedimiento de purificación de la PPasa de *H. pylori*.** A) Electroforesis en gel nativo de poliacrilamida al 10% teñido por actividad enzimática y B) teñido con plata de las fracciones obtenidas de: 1) el extracto crudo (10  $\mu\text{g}$  de proteína), 2) la desnaturalización a 60 °C (10  $\mu\text{g}$  de proteína), 3) la precipitación con sulfato de amonio al 90% (9.8  $\mu\text{g}$  de proteína), 4) la columna de Sephacryl S-200 (7  $\mu\text{g}$  de proteína), 5) la de  $\omega$ -aminohexilagarosa-PPi (7  $\mu\text{g}$  de proteína) y 6) la de Mono Q HR 5/5 (5.5  $\mu\text{g}$  de proteína).

Cuando el gel nativo de las diferentes fracciones del proceso de purificación se tiñó por actividad enzimática (Fig.9A), se observó una banda con  $R_f$  de 0.55 en todas las fracciones. En las fracciones obtenidas después de la precipitación con sulfato de amonio y de las columnas de Sephacryl S-200 y  $\omega$ -aminohexil agarosa-PPi (Fig.9A, líneas 3,4 y 5), se observó una segunda banda con  $R_f$  de 0.44 (el análisis de estas dos

bandas de actividad se describe más adelante en IV.3). Cuando el gel se tiñó por actividad utilizando *p*-nitro-fenilfosfato como sustrato, no hubo bandas de actividad enzimática.

La tinción con plata del gel nativo de las fracciones de purificación (teñido previamente por actividad enzimática) (Fig.9B), mostró una banda con  $R_f$  de 0.55 en todas las fracciones, que corresponde a la actividad enzimática observada. Durante el proceso de purificación se observó tanto el enriquecimiento de algunas bandas como la desaparición otras, con movilidades relativas mayores y menores de 0.55. En la fracción eluída de la columna de  $\omega$ -aminohexil agarosa-PPi (Fig. 9B, línea 5) se observaron nueve bandas proteicas y en la eluída de la columna de Mono Q se observaron cuatro bandas adicionales a la de  $R_f$  0.55, con menor movilidad relativa y una con mayor  $R_f$  (Fig. 9B, línea 6).

El análisis electroforético bajo condiciones desnaturalizantes de las fracciones eluídas de las columnas de  $\omega$ -aminohexilagarosa-PPi y de Mono Q se muestra en la Figura 10. La fracción activa obtenida de la columna de Mono Q (Fig. 10, línea 1) mostró una sola banda de proteína con un peso molecular de 19.1 kDa. En la fracción obtenida de la columna de  $\omega$ -aminohexilagarosa-PPi (Fig. 10, línea 2) se observaron cinco bandas proteicas, una de las cuales presenta un peso molecular igual al de la PPasa de *H. pylori* obtenida de la columna de Mono Q. Este resultado obtenido en el número de bandas proteicas en el gel desnaturalizante, probablemente se debe a que la cantidad de proteína cargada fue menor que la que se cargó en el gel nativo.



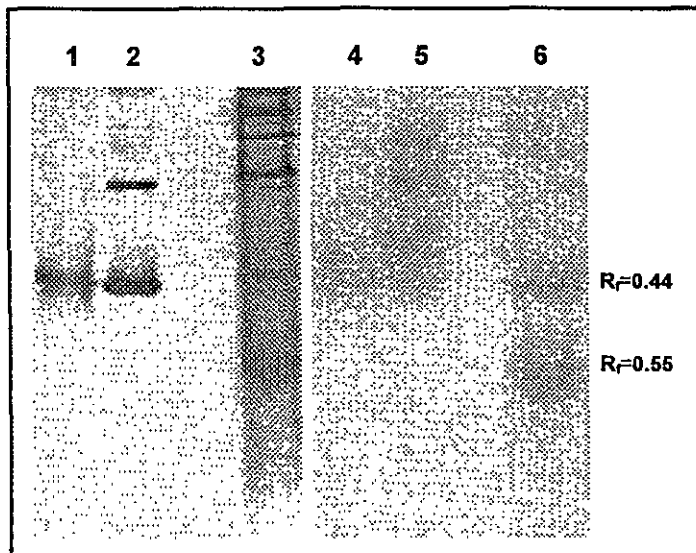
**Fig.10. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de la PPasa citoplásmica de *H. pylori*.** Gel de poliacrilamida-SDS al 16% teñido con plata. La PPasa de *H. pylori* (3  $\mu$ g de proteína) eluída de la columna de Mono Q (línea 1) y de la columna de  $\omega$ -aminohexil agarosa-PPi (línea 2) (6  $\mu$ g de proteína). Los marcadores de peso molecular (6  $\mu$ g de proteína) (línea 3): BSA (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), G3P-deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14 kDa).

#### IV.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la fracción de Sephacryl

**S-200.** Al iniciar el proceso de purificación de la PPasa, nos llamó la atención las dos banda de actividad que se observaron al seguir la presencia de la enzima por electroforesis en geles nativos de las fracciones eluídas de la columna de Sephacryl S-200, debido a que una de éstas bandas proteicas pudiera corresponder al monómero activo de la enzima, que no ha sido reportado en otras PPasas, por lo cual se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

La electroforesis en geles nativos teñidos con plata de las fracciones con actividad de PPasa eluídas de la columna de Sephacryl S-200, mostró once bandas de proteína (Fig. 9, línea 4 y Fig. 11, línea 3). Sin embargo, cuando se probó la actividad de la enzima con  $Mg-PPi^{2-}$  en un segmento idéntico del gel nativo, se observaron dos

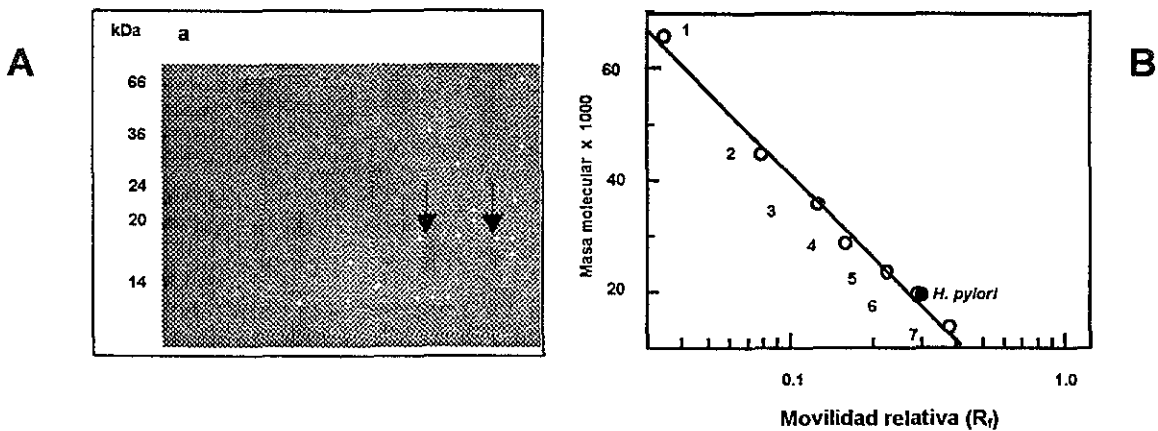
zonas de actividad con valores de  $R_f$  de 0.44 y 0.55. (Fig. 11, línea 6). Una de estas zonas ( $R_f = 0.44$ ) coincidió con la movilidad electroforética de las principales bandas de las PPasas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* usadas como control (Fig. 11, líneas 4 y 5, respectivamente). Este patrón de bandas de actividad no se modificó con la presencia de los inhibidores de proteasas PMSF y TPCK (100  $\mu\text{g/ml}$ , cada una) utilizados durante el proceso de purificación.



**Fig. 11. Electroforesis en gel nativo de la PPasa de *H. pylori* obtenida de la columna de Sephacryl S-200.** La proteína se separó en un gel de poliacrilamida al 12%, el cual se tiñó con plata (líneas 1 a 3) o por actividad enzimática (líneas 4 a 6). En el último caso, el medio de incubación fue Tris-maleato 50 mM (pH 8.5),  $\text{MgCl}_2$  3 mM y  $\text{NaPPi}$  2 mM durante 5 min para las PPasas de levadura y de *E. coli* o 30 min para la PPasa de *H. pylori* a 37 °C. Las líneas 3 y 6 con 4.6  $\mu\text{g}$  de proteína de la PPasa de *H. pylori*. Las líneas 1 y 4 con 6.6  $\mu\text{g}$  de proteína de la PPasa de levadura y las líneas 2 y 5, con 4.5  $\mu\text{g}$  de proteína de la PPasa de *E. coli*.



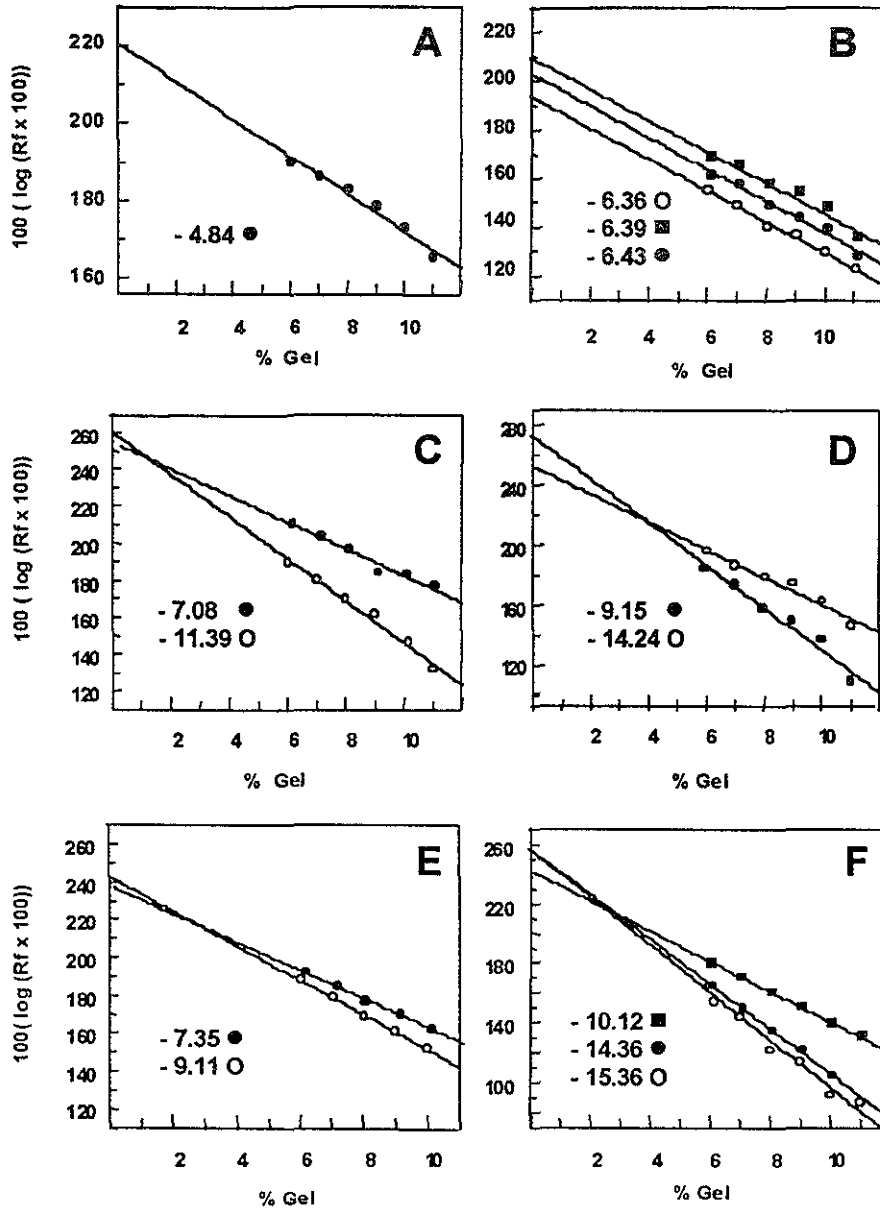
Para conocer la composición polipeptídica de las dos zonas de actividad observadas en el gel nativo, el carril de la PPasa de *H. pylori* se cortó longitudinalmente y se sometió a una electroforesis de segunda dimensión en un gel desnaturalizante el cual se tiñó con plata. En este gel bidimensional, cada zona de actividad mostró una sola banda de proteína (Fig. 12A), ambas con una movilidad relativa que corresponde a la misma masa molecular de  $19.1 \pm 0.24$  kDa ( $n=4$ ) (Fig. 12B), lo que sugiere que las dos bandas de actividad observadas en el gel nativo son oligómeros de un mismo monómero.



**Fig. 12. Determinación de la masa molecular monomérica de la PPasa de *H. pylori*.** **A)** Gel bidimensional de poliacrilamida-SDS al 16% de las dos bandas de actividad del gel nativo de la fracción eluída de la columna de Sephacryl S-200. **a)** marcadores de peso molecular. Las flechas señalan las bandas proteicas que corresponden a las dos bandas de actividad de PPasa en el gel nativo. **B)** El logaritmo de la movilidad relativa ( $R_f$ ) del monómero de la PPasa de *H. pylori* ( $\bullet$ ) y de las proteínas estándares ( $\circ$ ) versus su masa molecular. Los estándares fueron: 1) BSA (66 kDa), 2) ovoalbúmina (45 kDa), 3) G3P-deshidrogenasa (36 kDa), 4) anhidrasa carbónica (29 kDa), 5) tripsinógeno (24 kDa), 6) inhibidor de tripsina (20 kDa) y 7)  $\alpha$ -lactoalbúmina (14 kDa).

Con el propósito de determinar si las dos bandas de actividad enzimática en el gel nativo correspondían a isómeros de carga o isómeros de peso molecular, se construyeron gráficas de Ferguson con los datos obtenidos de un grupo de geles nativos con concentraciones de Bis/acrilamida (1:30) entre 6 y 11%. Los resultados típicos de estas gráficas obtenidas con las proteínas estándares y con las PPasas de *H. pylori* y *E. coli* se muestran en la Figura 13. Las gráficas con más de una línea representan las formas multiméricas de la proteína. Cuando las líneas no son paralelas e intersectan en un punto cercano a una concentración del gel entre 2 y 3% indica que se trata de isómeros de peso molecular (Hedrick y Smith, 1968), como es el caso de las proteínas ovoalbúmina y albúmina sérica bovina (Fig. 13 C y D, respectivamente). Los isómeros de carga producen una familia de líneas paralelas (Hedrick y Smith, 1968), como es el caso de la anhidrasa carbónica (Fig. 13B).

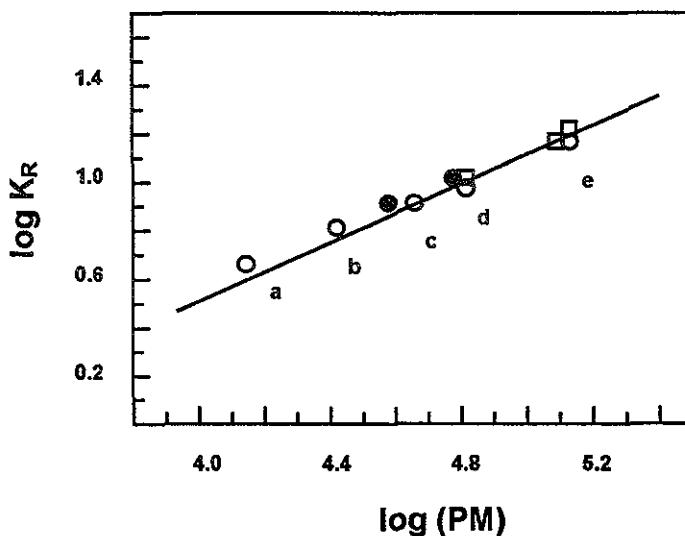
Las gráficas de Ferguson de las PPasas de *H. pylori* y *E. coli* (la última usada como control) (Fig. 13 E y F, respectivamente), indican que las bandas de actividad son isómeros de peso molecular.



**Fig. 13. Gráficas de Ferguson.** Las gráficas son típicas de la electroforesis en geles nativos de: **A)**  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2 kDa), **B)** anhidrasa carbónica (29 kDa), **C)** ovoalbúmina (45 kDa), **D)** BSA (66 y 132 kDa, monómero y dímero, respectivamente), **E)** PPasa de *H. pylori* y **F)** PPasa de *E. coli*. Las condiciones de la electroforesis se describen en el texto. El análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados se utilizó para determinar la pendiente de cada grupo de datos. Las pendientes negativas de cada línea, que corresponden al coeficiente de retardo ( $K_R$ ), se anotan en cada figura.

El peso molecular de los isómeros de la PPasa de *H. pylori* se obtuvo a través del análisis de regresión lineal de cada uno de los datos obtenidos de las proteínas estándares en las gráficas de Ferguson para determinar la pendiente o coeficiente de retardo ( $K_R$ ) y poder graficar el logaritmo de  $K_R$  versus el logaritmo de su peso molecular (Fig. 14). De esta última gráfica se obtuvieron los pesos moleculares de 38,904 y 57,543 para los isómeros de la PPasa de *H. pylori*. Si tomamos en cuenta el peso molecular del monómero de esta enzima (19,100), estos isómeros podrían corresponder a formas dimérica y trimérica de la enzima, siempre y cuando, las subunidades que forman el agregado mantengan un arreglo lineal. Es importante señalar que cuando la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida se emplea para el análisis de una serie de oligómeros, la relación entre el peso molecular (o el número de subunidades) y  $K_R$  no puede predecirse a menos de que se defina un modelo de la estructura cuaternaria del estado de agregación. Si los oligómeros tienen un arreglo lineal de esferas (como en una hebra), entonces el área de superficie ( $K_R$ ) es proporcional al número de subunidades ( $n$ ). Si las subunidades se unen en una esfera común, entonces el área de superficie ( $K_R$ ) es asintóticamente parecida a  $n^2$ . Las esferas estrechamente empacadas darán un resultado intermedio. Un tetrámero tetraédrico estrechamente empacado tendrá esencialmente la misma área de superficie que un trímero lineal. La relación entre  $K_R$  y el peso molecular de los agregados se encuentra influenciada por el radio efectivo del poro del gel, especialmente cuando uno trata con especies de bajo peso molecular o con concentraciones altas del monómero de acrilamida que se emplea como agente de entrecruzamiento en la reacción de polimerización del gel (Chrambach y Rodbard, 1971).

Los resultados obtenidos de los geles teñidos por actividad enzimática sugieren que las PPasas enzimáticamente activas pueden presentarse en varios estados de agregación. Estas formas activas de la enzima en *H. pylori* podrían estar relacionadas con las formas activas triméricas y monoméricas reportadas para *E. coli* (Borschik y col., 1985, 1986), debido a que ambas PPasas pertenecen a la subclase A de las PPasas, de acuerdo a la clasificación de Young y col. (1998), y comparten algunas características.



**Fig. 14. Determinación del peso molecular de los isómeros de la PPasa de *H. pylori*.** La relación entre el logaritmo de los coeficientes de retardo ( $K_R$ ) y el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas estándares (O), fue utilizada para determinar el peso molecular de los isómeros de las PPasas de *H. pylori* (●) y de *E. coli* (□). Las proteínas estándares: a)  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2 kDa), b) anhidrasa carbónica (29 kDa), c) ovoalbúmina (45 kDa), d) BSA monómero (66 kDa) y e) BSA dímero (132 kDa). Los valores de  $K_R$  de cada proteína se encuentran anotados en la figura 13.

Por otro lado, aunque se ha reportado que la estructura hexamérica de la PPasa de *E. coli* solo puede ser disociada por tratamientos severos como es la incubación con altas concentraciones de urea (Wong y col., 1970), por isopropanol (Borschik y col., 1985), pH bajo (Borschik y col., 1986) o por mutagénesis dirigida de los residuos His-136 e His-140 que se encuentran en la interfase trímero-trímero (Baykov y col., 1995); también se ha reportado que la forma trimérica de la PPasa se presenta en ausencia de  $Mg^{2+}$  (Hachimori y col., 1979; Baykov y col., 1995). En el presente trabajo, la ausencia de  $Mg^{2+}$  durante la electroforesis en geles nativos de las fracciones obtenidas por el proceso de purificación, excepto en el extracto crudo y en las fracciones de la desnaturalización a 60 °C y de la columna de Mono Q, podría explicar la aparición de los dos isómeros de la PPasa de *H. pylori* con actividad hidrolítica que se presentan en estas fracciones (ver Fig. 9A).

**IV.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos del N-terminal de la PPasa.** La secuencia de los primeros diez aminoácidos del N-terminal de la banda proteica correspondiente a la PPasa de la cepa 8823 de *H. pylori*, obtenida de la columna de Mono Q, es similar a la secuencia de aminoácidos del N-terminal de la PPasa de la cepa 26695 de *H. pylori* (Tomb y col., 1997) que se predice de la secuencia de nucleótidos del genoma. La secuencia de aminoácidos de la enzima purificada en este trabajo presenta una sustitución conservada (I por V) (Tabla 3), demostrándose que la banda con valor de  $R_f$  de 0.55 es la PPasa citoplásmica.

La comparación de la secuencia del N-terminal de la PPasa citoplásmica de *H. pylori* de la cepa 8823 con la secuencia de aminoácidos que se predice de la secuencia de nucleótidos del genoma de la cepa J99 de *H. pylori* para la PPasa (Alm y col., 1999), también muestra similitud. En esta comparación se presentan dos sustituciones de aminoácidos, una de tipo conservada (E por D) y otra de tipo no conservada (K por Q) (Tabla 3). Es muy probable que esta sustitución no conservada no altere la función de la enzima.

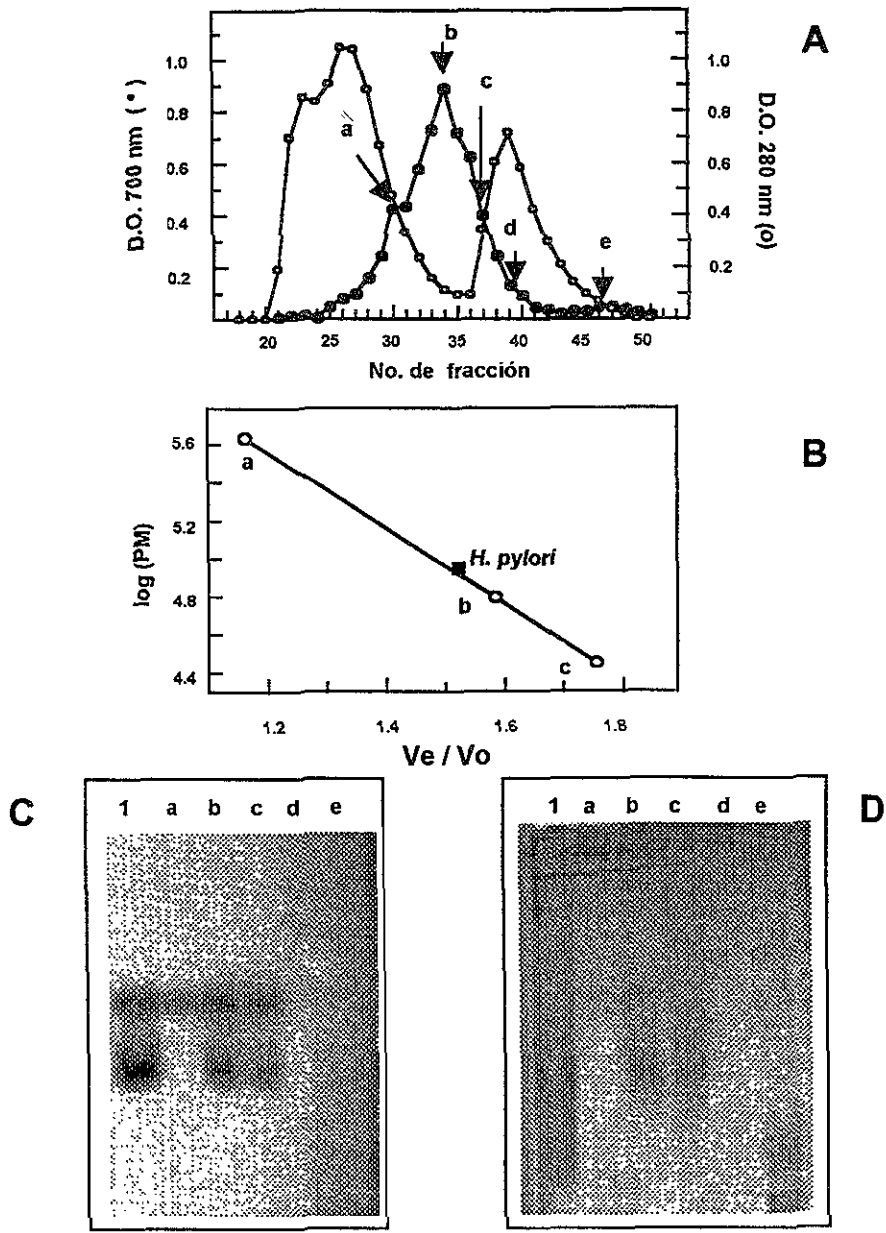
SECUENCIA N-TERMINAL de la PPasa de <i>H. pylori</i>	
<i>H. pylori</i> cepa 8823	M N L E K L E I S H
<i>H. pylori</i> cepa 26695	M N L E K L E V S H
<i>H. pylori</i> cepa J99	M N L D Q L E V S H

**Tabla 3. Comparación de la secuencia del N-terminal de la PPasa citoplásmica de *H. pylori*.** La secuencia N-terminal de la PPasa citoplásmica de la cepa 8823 de *H. pylori* obtenida en este trabajo, se comparó a través de Swissprot Data Bank con las secuencias de aminoácidos del N-terminal que se predicen de las secuencias de nucleótidos del genoma para las PPasas en las cepas 26695 y J99 de *H. pylori*.

Con los resultados obtenidos hasta aquí, podemos decir que las propiedades estructurales de la PPasa citoplásmica de *H. pylori* son similares a aquellas que presentan otras PPasas solubles. Las PPasas citoplásmicas son generalmente proteínas oligoméricas de subunidades idénticas. Las PPasas de organismos eucariotes tienen una estructura dimérica con subunidades de aproximadamente 30 kDa (Cohen y col., 1978; Hachimori y col., 1983). Las PPasas bacterianas (Wong y col., 1970) y de arqueobacterias (Verhoeven y col., 1986; Richter y Schäfer, 1992; van Alebeek y col., 1994) forman complejos hexaméricos o tetraméricos de monómeros idénticos cercanos a 20 kDa. Una excepción al esquema bacteria/arqueobacteria de la PPasa es la aislada del metanógeno *Methanotheroxiphilium soehngenii* que presenta una composición de subunidades  $\alpha_2\beta_2$  con una masa molecular de 33 kDa para la subunidad  $\alpha$  y 35 kDa para la subunidad  $\beta$  (Jetten y col., 1992). La PPasa de *H. pylori* se ajusta al esquema bacteria/arqueobacteria de esta enzima, con una estructura aparente hexamérica (ver IV.5) de subunidades idénticas de alrededor de 19 kDa.

Al contar actualmente con las secuencias del genoma de las cepas 26695 y J99 de *H. pylori* (Tomb y col., 1997; Doig y col., 1999), se tiene la predicción de las secuencia que codifican a la PPasa (gene No. 0620 en la cepa 26695, y No. 564 en la cepa J99), las cuales tienen un 50% de identidad con la PPasa de *E. coli*. La masa molecular de la subunidad de la PPasa que se calcula de la secuencia de nucleótidos es de 19.2 kDa, valor muy cercano al obtenido en este trabajo.

**IV.5. Determinación de la masa molecular relativa de la PPasa citoplásmica nativa.** La masa molecular relativa de la PPasa nativa de la fracción eluída de la columna de  $\omega$ -aminohexil agarosa-PPi se estimó por filtración en gel en una columna de Sephacryl S-300 y su perfil de elución se muestra en la Fig. 15A. La enzima eluída en una posición que corresponde a  $V_e/V_o = 1.51$ , indica una masa molecular de  $102.7 \pm 10$  kDa ( $n=3$ ) (Fig. 15B). Estos resultados sugieren que la PPasa citoplásmica nativa de *H. pylori* es un hexámero de monómeros idénticos de  $19.1 \pm 0.26$  kDa, comparable a la enzima de *E. coli*, la cual está compuesta de seis monómeros de 19.5 kDa produciendo un hexámero de 118 kDa (Wong y col., 1970).



**Fig. 15. Filtración en gel.** A) Perfil de elución en una columna de Sephacryl S-300 de la actividad de la PPasa de *H. pylori* determinada por absorbencia a 700 nm (●). La determinación de proteína por absorbencia a 280 nm (○). Las flechas indican las fracciones analizadas por electroforesis. B) Gráfica para determinar la masa molecular de la PPasa nativa de *H. pylori* (■) de los datos obtenidos de los volúmenes de elución de las proteínas en A. Las proteínas estándares (○) fueron: a) ferritina (440 kDa), b) PPasa de levadura (66 kDa), y c) anhidrasa carbónica (29 kDa). C) Gel nativo de poliacrilamida al 10% teñido por actividad enzimática y D) teñido con plata de la PPasa obtenida de la columna de  $\omega$ -aminohexil agarosa-PPi (1) y de las fracciones de la columna de Sephacryl S-300 señaladas en A con flechas a, b, c, d y e.



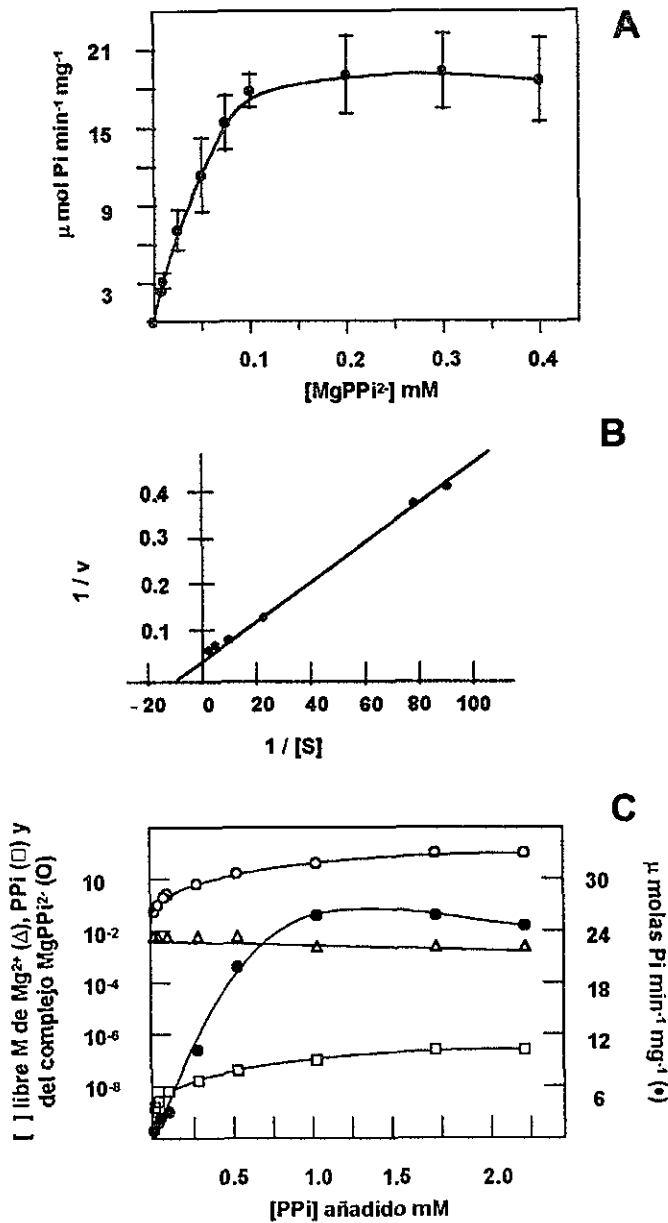
El análisis electroforético en gel nativo de algunas de las fracciones del pico de la PPasa citoplásmica eluido de la columna de Sephacryl S-300 (Fig. 15A), teñido por actividad enzimática (Fig. 15C), mostró las mismas dos bandas de actividad que se presentaron en el análisis electroforético de las fracciones obtenidas en las cromatografías del proceso de purificación (Fig. 9A). Esto sugiere que probablemente las condiciones electroforéticas mencionadas en el capítulo IV.3. promueven la desagregación de la estructura oligomérica de la enzima, debido a que la masa molecular de la enzima nativa estimada por filtración en gel fue de  $102.7 \pm 10$  kDa ( $n=3$ ) (Fig. 15B).

**IV.6. Especificidad de sustrato y propiedades catalíticas de la PPasa citoplásmica.** La PPasa citoplásmica de *H. pylori* parcialmente purificada es altamente específica al sustrato Mg-PPi<sup>2-</sup>. La enzima no es capaz de hidrolizar otros sustratos fosforilados como son: tripolifosfato (PPPi), glucosa 6-fosfato, glucosa 1-fosfato,  $\beta$ -glicerofosfato, ATP, ADP, AMP y *p*-nitrofenil-fosfato como se muestra en la Tabla 4. La ausencia de la actividad hidrolítica con *p*-nitrofenilfosfato como sustrato y la ausencia de inhibición con molibdato de sodio, que se muestra mas adelante, indican que la preparación de la PPasa citoplásmica no se encuentra contaminada con fosfatasas.

Sustrato	$\mu$ mol Pi min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>
PPi	21.42
Tripolifosfato	0
Glucosa-6-P	0.10
Glucosa-1-P	0
$\beta$ -glicerofosfato	0.20
ATP	0.20
ADP	0.68
AMP	0.16
<i>p</i> -nitrofenilfosfato	0

**Tabla 4. Especificidad de sustrato de la PPasa citoplásmica de *H. pylori*.** La enzima (3  $\mu$ g de proteína) obtenida de la columna de  $\omega$ -aminohehil agarosa-PPi se empleó para determinar la actividad con los diferentes sustratos. El medio de reacción contenía: Tris-maleato 50 mM (pH 8.5), MgCl<sub>2</sub> 3 mM y 2 mM de los sustratos señalados. La reacción se llevó a cabo durante 25 min a 37 °C.

La velocidad de reacción a diferentes concentraciones de  $\text{Mg-PPi}^{2-}$  sigue una cinética de Michaelis-Menten (Fig. 17A). Una gráfica de Lineweaver-Burk (Fig. 17B) indica una  $K_m$  aparente de  $90 \mu\text{M}$  y una  $V_{\text{max}}$  de  $24.0 \mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Estos parámetros cinéticos se obtuvieron de las velocidades iniciales de reacción a pH 8.5 utilizando el método de Ames (1966). La relación  $\text{Mg}^{2+}/\text{PPi}$  se mantuvo en 1 y la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  libre en  $1 \text{ mM}$ , como se muestra en la Fig. 17C. Si la concentración libre de  $\text{Mg}^{2+}$  no se mantiene fija, la curva de saturación de sustrato adquiere una forma sigmoideal, sugiriendo este resultado que el  $\text{Mg}^{2+}$  libre tiene un efecto activador sobre la enzima.



**Fig. 17. Cinética de hidrólisis de Mg-PPi<sup>2-</sup>.** **A)** Curva de saturación de sustrato. Las condiciones de ensayo fueron: Tris-maleato 50 mM (pH 8.5) y las concentraciones del complejo Mg-PPi<sup>2-</sup> se indican en la abscisa. La concentración de Mg<sup>2+</sup> libre se mantuvo fija en 1 mM. El tiempo de incubación fue de 3 min a 37 °C con 3 μg de proteína. Las barras representan la desviación estándar (n=3). **B)** Gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de la gráfica A. **C)** Curva de las concentraciones libres de Mg<sup>2+</sup> (Δ), PPi (□) y del complejo MgPPi<sup>2-</sup> (○) calculadas a través del programa de cómputo de Fabiato (1988), utilizando el valor de log K<sub>s</sub> = 6, para el complejo MgPPi<sup>2-</sup>. Actividad hidrolítica enzimática (●).

Todas las PPasas citoplásmicas y membranales requieren  $Mg^{2+}$  para formar el sustrato hidrolítico y en forma libre para activar o regular a la enzima (Lahti, 1983). En algunas PPasas (Josse, 1966; Butler, 1971; Celis y Romero, 1987), se ha encontrado que otros cationes divalentes pueden activar a la enzima.

La Figura 18 muestra la dependencia de cationes de la PPasa citoplásmica de *H. pylori*. En ella se observa que otros cationes ( $Mn^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+}$ ) sustituyen parcialmente al  $Mg^{2+}$  para formar el complejo con PPI y producen una actividad hidrolítica limitada. El  $Ca^{2+}$  no produjo actividad enzimática a las concentraciones probadas y no hubo actividad en ausencia de cationes divalentes en el medio de reacción.

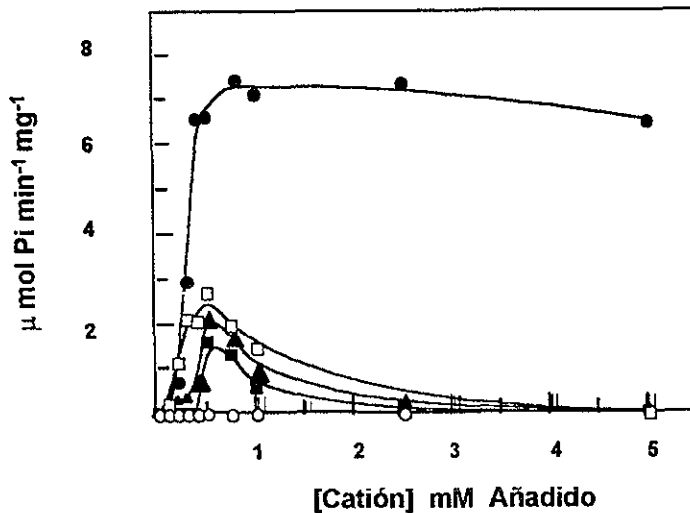


Fig. 18. Efecto de la concentración de cationes divalentes sobre la hidrólisis de PPI. Las condiciones de ensayo fueron las siguientes: Tris-maleato 50 mM (pH 8.5), NaPPI 0.5 mM y las concentraciones de cationes divalentes variaron como se indica en la gráfica.  $Mg^{2+}$  (●),  $Zn^{2+}$  (□),  $Co^{2+}$  (▲),  $Mn^{2+}$  (■) y  $Ca^{2+}$  (○). El tiempo de incubación fue de 20 min a 37 °C.

La respuesta de la actividad de la PPasa se determinó a la concentración total de cationes divalentes señalados en la abscisa de la Fig.18, manteniéndose una

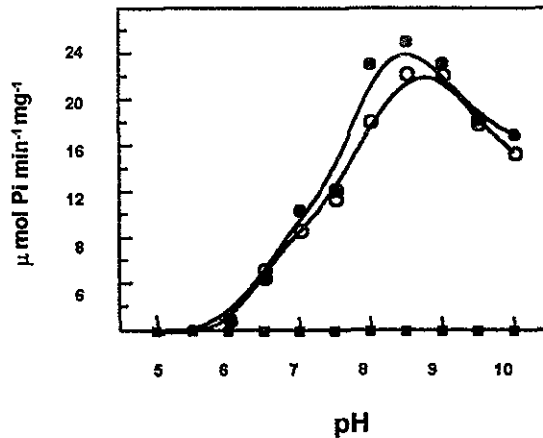
concentración constante de 0.5 mM de PPI, para formar el sustrato con  $MgCl_2$  en una relación 1:1 y observar el efecto del aumento de la concentración libre del catión. En esta gráfica es evidente dos tipos de efecto dados por los cationes divalentes, con  $MgCl_2$  se observa una curva de saturación de sustrato sigmoideal con una velocidad máxima cuando la relación  $MgCl_2 / PPI^{2-}$  es cercana a 1, lo que sugiere que el sustrato funcional es  $Mg-PPI^{2-}$ . Con los otros cationes se observa una curva bifásica, teniendo una actividad máxima cuando la relación catión/PPI es cercana a 1, y por arriba o abajo de esta concentración, la actividad hidrolítica disminuye. La inhibición a concentraciones altas del catión probablemente se debe al aumento de la concentración del catión libre en la mezcla de reacción (Celis y Romero, 1987).

La especificidad de sustrato y catión de la PPasa citoplásmica de *H. pylori* es característica de las PPasas. La enzima es absolutamente dependiente de cationes divalentes para su acción catalítica y el  $Mg^{2+}$  es el catión que le confiere la mayor actividad. Los cationes  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  pueden reemplazar parcialmente al  $Mg^{2+}$ , pero la efectividad de estos cationes se limita a un estrecho margen de concentración (0.3-1.0 mM). En la mayoría de las PPasas estudiadas se ha observado la preferencia por  $Mg^{2+}$  para su actividad hidrolítica, pero existen algunas excepciones como son la PPasa de *Bacillus subtilis*, que presenta mayor actividad con  $Mn^{2+}$  (Tono y col., 1967) y la PPasa de *Rhodospseudomonas palustris*, la cual alcanza la máxima actividad hidrolítica con  $Ca^{2+}$  (Schwarm y col., 1986). En el caso de la PPasa de *H. pylori* el complejo  $Mg-PPI^{2-}$  parece ser el único sustrato.

**IV.7. Efecto del pH e inhibidores sobre la actividad de la PPasa citoplásmica.** La Figura 19 muestra que la actividad óptima de la enzima se encuentra a un pH de 8.5. Cabe señalar que no se observó actividad enzimática a pHs por debajo de 5.5. Cuando se emplearon otros sistemas amortiguadores (MES, MOPS, AMPPO y CHES) en sus respectivos intervalos de capacidad amortiguadora, los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados con Tris-maleato.

Con 5 mM de molibdato de sodio no se observó inhibición de la actividad enzimática a ningún pH probado (Fig. 19), y como se mencionó anteriormente, al no

presentarse actividad hidrolítica con *p*-nitrofenilfosfato, se confirma que la preparación no se encuentra contaminada con fosfatasa inespecíficas.



**Fig. 19. Efecto del pH sobre la actividad de la PPasa citoplásmica de *H. pylori*.** Las condiciones de ensayo fueron: Tris-maleato 50 mM a los valores de pH que se indican en la abscisa, NaPPi 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM y 4.88  $\mu\text{g}$  de proteína. La actividad hidrolítica en ausencia de inhibidores (●) y en presencia de NaF 10 mM (▲) y de molibdato de sodio 5 mM (○).

El pH óptimo de 8.5 para la actividad de la PPasa de *H. pylori* es similar a la de la mayoría de las PPasas (pH 8.3-9.8) (Josse, 1966; Hachimori y col., 1975; Tominaga y Mori, 1977; Verhoeven y col., 1986). Solamente las PPasas de arqueobacterias metanógenas y dos PPasas de termófilas presentan un pH óptimo menor (pH 6.5-8) (van Alebeek y col., 1994; Jetten y col., 1992; Richter y Schäfer, 1992; Meyer y col., 1995).

El fluoruro, un inhibidor específico de las PPasas, inhibió la actividad enzimática al 100%, cuando se empleó a una concentración de 10 mM (Fig. 19). Con el propósito

de determinar la concentración de fluoruro de sodio que inhibe el 50% de la actividad enzimática ( $I_{50}$ ), se realizó una curva de actividad de la PPasa a diferentes concentraciones de NaF (Fig. 20), los resultados indican que con 0.5 mM de NaF se alcanza el 90% de inhibición de la PPasa. El  $I_{50}$  obtenido de ésta gráfica es de 40  $\mu$ M.

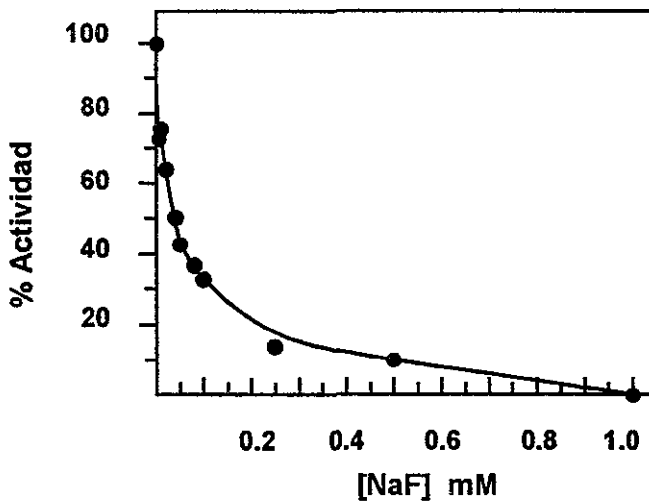


Fig. 20. Inhibición de la actividad de la PPasa citoplásmica de *H. pylori* por NaF. Las condiciones de ensayo fueron las mismas que en la figura 19, pero el pH se mantuvo en 8.5 y las concentraciones de NaF se indican en la gráfica.

El NaF inhibe a la PPasa de *H. pylori* igual que a las PPasas de otros organismos. La inhibición por NaF de la PPasa de levadura ha sido la más estudiada y se ha propuesto que el fluoruro fortalece el enlace de la enzima por el sustrato  $Mg-PPi^{2-}$ , resultando en un enlace covalente (Baykov y col., 1976, 1977). Sin embargo, no todas las PPasas interactúan de la misma manera con el fluoruro. Las PPasas de organismos eucariotes parecen ser más sensibles al fluoruro, como es el caso de las PPasas de levadura y de cerebro porcino que se inhiben al 50% con 6.7  $\mu$ M y 50  $\mu$ M de NaF, respectivamente. Las PPasas bacterianas y de arqueobacterias son menos sensibles al

fluoruro: las PPasas de *Rhodopseudomonas palustris* (Schwarm y col., 1986) y *Methanobacterium thermoautotrophicum* (van Alebeek y col., 1994) se inhiben al 50% con 5 mM y 0.9 mM de NaF, respectivamente. El 91% de inhibición de la PPasa de *E. coli* se alcanza con 1 mM de NaF (Josse, 1966) y la enzima de *Thiobacillus* se inhibe al 80% con 1.25 mM del inhibidor (Tominaga y col., 1977). Mientras algunas PPasas bacterianas no se inhiben con fluoruro como la mayoría [*Streptococcus* (Lahti y col., 1981), *Ureaplasma* (Davis y col., 1987) y *Methanotherix soehngenii* (Jetten y col., 1992)], la sensibilidad de la PPasa de *H. pylori* ( $I_{50}=40 \mu\text{M}$ ) parece ser más alta que la sensibilidad de la mayoría de las PPasas bacterianas.

Es importante señalar que todo el procedimiento aquí descrito para la purificación y la caracterización de la PPasa, excepto el análisis de la secuencia N-terminal de la enzima, se realizó también con la cepa N2 de *H. pylori*, obteniéndose resultados similares.

El papel de la PPasa de *H. pylori* parece ser muy claro, como la enzima tiene una localización citoplásmica no participa en la conservación de energía, su función como la de otras PPasas citoplásmicas es mantener la concentración de PPI baja. Por otro lado, no puede descartarse la posibilidad de que la hidrólisis de PPI pudiera proveer de alguna energía a otras vías biosintéticas.



## V. CONCLUSIONES

### La PPasa de *Helicobacter pylori*:

- 1) Se localiza en el citosol.
- 2) Es específica para el sustrato  $Mg\text{-PPi}^{2-}$ .
- 3) El pH óptimo de su actividad es de 8.5.
- 4) Es sensible a NaF con un  $I_{50} = 40 \mu\text{M}$ .
- 5) La velocidad de reacción sigue una cinética de Michaelis-Menten con una  $V_{\text{max}}$  de  $24.0 \mu\text{molas Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  y una  $K_m = 90 \mu\text{M}$ .
- 6) Es dependiente de cationes divalentes para su catálisis. El  $Mg^{2+}$  le confiere la mayor actividad; sin embargo,  $Mn^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+}$  pueden reemplazar parcialmente al  $Mg^{2+}$ .
- 7) En su forma nativa la enzima presenta una masa molecular de 103 kDa y la forma monomérica de 19.1 kDa.
- 8) Su función, como la de las otras PPasas citoplásmicas, es mantener la concentración de PPI baja dentro de la célula. Se requieren más estudios para determinar la posible participación de la PPasa en otros eventos celulares.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Adams, R.D., Braunwald, E., Isselbacher, K.J. and Petersdorf, R.G. (1981) Harrison. Principles of Internal Medicine. 8<sup>th</sup> ed. pp-1617-35. Mc-Graw Hill, Co., Inc. New York.
- Ahn, K., and Kornberg, A. (1990). Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. **J Biol Chem** 265: 11734-39.
- Akiyama, M., Crooke, E. and Kornberg, A.. (1993) An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. **J Biol Chem** 268: 633-39.
- Alm, R.A., Ling, L-S., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan, B.C., Guild, B.C., de Jonge, B.I., Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F. and Trust, T.J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature** 397: 176-180.
- Ames, B.N. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. **Meth Enzymol** VIII: 115-118.
- Andreeva, N. and Okorokov, L. (1993) Purification and characterization of highly active and stable polyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* cell envelope. **Yeast** 9: 127-139.
- Archibald, F. and Fridovich, I. (1982) Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. **Arch Biochem Biophys** 215: 589-96.
- Baltscheffsky, M. (1978) Photosynthetic Phosphorylation. In: Clayton RK, Sistrom WR (eds) In: The Photosynthetic Bacteria, Plenum Press, New York, pp 595-613.
- Baltscheffsky, M. and Nyrén, P. (1984) In: The synthesis and utilization of inorganic pyrophosphate. Bioenergetics (ed. L. Ernster) pp 187-206, Elsevier, Amsterdam.
- Baltscheffsky, H. and von Stedingk, L. (1966) Bacterial photophosphorylation in the absence of added nucleotide. A second intermediate stage of energy transfer in light-induced formation of ATP. **Biochem Biophys Res Commun** 22: 722-28.
- Baykov, A.A., Artjukov, A.A. and Avaeva, S.M. (1976) Fluoride inhibition of inorganic pyrophosphatase. I. Kinetics studies in a  $Mg^{2+}$ -PPi system using a new continuous enzyme method. **Biochim Biophys Acta**. 429: 982-992.
- Baykov, A.A., Bakuleva, N.P., Nazarova, T.I. and Avaeva, S.M. (1977) Fluoride inhibition of inorganic pyrophosphatase. II. Isolation and characterization of a covalent intermediate between enzyme and entire substrate molecule. **Biochim Biophys Acta**. 481: 184-194.
- Baykov, A.A., Dudarenkov, V.Y., Käpylä, J., Salminen, T., Hyytiä, T., Kasho V.N., Husgafvel, S., Cooperman B.S., Goldman, A and Lahti, R. (1995) Dissociation of hexameric *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase into trimers on His-136 → Gln or His-140 → Gln substitution and its effect on enzyme catalytic properties. **J Biol Chem**. 270: 30804-30812.
- Benaïssa, M., Babin, P., Quellard, N., Pezennec, L., Cenatiempo, Y. And Fauchère, J-L. (1996) Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. **Infect Immun**. 64 (6): 2331-2335.
- Berg, H. and Turner, L. (1979) Movement of microorganisms in viscous environments. **Nature**. 278: 349-351.
- Blaser, M. (1993) *Helicobacter pylori*: microbiology of a "slow" bacterial infection. **Trends Microb** 259:255-259.
- Bode, G., Mauch, F. and Malfertheiner, P. (1993a) The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. **Epidemiol Infect**. 111:483-490.
- Bode, G., Mauch, F. Ditschuneit, H. and Malfertheiner, P. (1993b) Identification of structures containing polyphosphate in *Helicobacter pylori*. **J Gen Microbiol** 139: 3029-33.
- Bonting, C., Kortstee, G. and Zehnder, A. (1991) Properties of polyphosphate:AMP phosphotransferase of *Acinetobacter* strain 210A. **J Bacteriol** 173: 6484-88.
- Boren, T., Falk, P., Roth, K.A., Larson, G. and Normark, S. (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. **Science** 262: 1892-95.

- Borschik, I.B., Pestova, T.V., Sklyankina, V.A. and Avaeva, S.M. (1985) The quaternary structure of *E.coli* inorganic pyrophosphatase is not required for catalytic activity. **FEBS Lett.** 184: 65-67.
- Borschik, I.B., Pestova, T.V., Sklyankina V.A. and Avaeva, S.M. (1986) Monomeric form of *E. coli* pyrophosphatase. Regulatory properties stability and interaction with affinity inhibitors. **Broorg Khim.** 12: 902-905.
- Briones, M.A. (2000) Efectos de inhibidores del metabolismo energético de *Helicobacter pylori*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM., México.
- Buck, G. and Smith, J. (1987) Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. **J Clin Microbiol** 25: 597-99.
- Burns, B.P., Hazell, S.L. and Mendz, G.L. (1995) Acetyl-CoA carboxylase activity in *Helicobacter pylori* and requirement of increased CO<sub>2</sub> for growth. **Microbiology** 141: 3113-8.
- Burns, B.P., Mendz, G.L. and Hazell, S.L. (1993) Characterisation of the glucose transport in *Helicobacter pylori*. **Acta Gastroenterol Belg** 56 (suppl): 44.
- Butler, L.G. (1971) Yeast and other inorganic pyrophosphatases. In: Boyer PD (ed) *The enzymes*, vol 4, Academic Press, Inc. New York, pp 529-541.
- Calam, J., Gibbons, A., Healey, Z., Bliss, P. and Arebi, N. (1997). How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage?. Its effects on acid gastrin physiology. **Gastroenterology**. 113 (Supp 6): S43-S49.
- Catrenich, C.E. and Makin, M.K. (1991) Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* bacillary to coccoid forms. **Scand J Gastroenterol**. 26 (Supp 181): 58-64.
- Celis, H. and Romero, I. (1987) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: effects of pH and divalent cations. **J Bioenerg Biomembr.** 19: 255-272.
- Clyne, M. and Drumm, B. (1997) Adherence of *Helicobacter pylori* to gastric mucosa. **Can J Gastroenterology**. 11: 243-248.
- Cohen, S.A., Sterner, R., Keim, P.S. and Henrikson, R.L. (1978) Covalent structural analysis of yeast inorganic pyrophosphatase. **J Biol Chem.** 253:889-897.
- Cooperman, B.S., Ning Yu Chin, Bruckmann, R.H., Bunick, G.J and McKenna, G.P. (1973) Yeast inorganic pyrophosphatase. I. New methods of purification, assay and crystallization. **Biochemistry**. 12: 1665-1669.
- Corthesy-Theulaz, I., Vaney, A.C., Haas, R., Saraga, E., Kraehenbuhl, J.P., Blum, A.L., Michetti, P. (1994) *H. pylori* urease B subunit as a therapeutic vaccine against *H. felis* infection (abstract). **Gastroenterology**. 106: A668.
- Correa, P., Fox, J., Foutham, E., Ruiz, B., Lin, Y., Zavala, D., Taylor, N., Mackinley, D., de Lima, E., Portilla, H. and Zarama, G. (1990) *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. Serum antibody prevalence in populations with contrasting cancer risks. **Cancer** 66 : 2569-2574.
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Figura, N. et al. (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. **Proc Natl Acad Sci USA** 90: 5791-95.
- Cover, T. and Blaser, M. (1992a) *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. **Annu Rev Med.** 43: 135-145.
- Cover, T. and Blaser, M. (1992b) Purification and Characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem** 267: 10570-75.
- Cover, T., Dooley, C. and Blaser, M. (1990) Characterization of an human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* Broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. **Infect Immun** 58: 603-10.
- Cover, T., Reddy, L. and Blaser, M. (1993) Effects of ATPase inhibitors on the response of HeLa *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. **Infect Immun** 61: 1427-31.
- Czinn, S.J. and Nedrud, J.G. (1991) Oral immunization against *Helicobacter pylori*. **Infec Immun** 25: 2359-2363.

- Chalk, P.A., Roberts, A.D. and Blows, W.M. (1994) Metabolism of pyruvate and glucose by intact cells of *Helicobacter pylori* studied by C-13 NMR spectroscopy. **Microbiology**. 140: 2085-2092.
- Chan, W.Y. Hui, P.K., Leung, K.M., Chow, J., Kwok, F. and Ng, C.S. (1994) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. **Am J Clin Pathol**. 102: 503-507.
- Chen, M., Lee, A. and Hazell, S. (1992) Immunization against gastric *Helicobacter* infection in a mouse/*Helicobacter felis* model. **Lancet**. 339: 1120-1121.
- Chiba, N., Rao, B., Rademaker, J. and Hunt, R. (1992) Meta-analysis of the efficacy of antibiotic therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. **Am J Gastroenterol** 87: 1716-27.
- Chrambach, A. and Rodbard, D. (1971) Polyacrylamide gel electrophoresis. **Science**. 172: 440-451.
- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis II. Methods and application to serum proteins. **Ann NY Acad Sci** 121: 404-427.
- Davis, J.W., Moses, I.S., Ndubuka, C. and Ortiz, R. (1987) Inorganic pyrophosphatase activity in cell-free extracts of *Ureaplasma urealyticum*. **J Gen Microbiol**. 133:1453-1459.
- Dawnes, E. and Senior, P. (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**. 10: 135-266.
- De Meis, L. (1984) Phosphorylation of high and low energy. Contributions of pH, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and water to free energy of hydrolysis. **J Biol Chem**. 259: 6090-6097.
- Dixon, M.F. (1991) *Helicobacter pylori* and peptic ulceration: histopathological aspects. **J Gastroenterol Hepatol**. 6: 125-130.
- Doig, P., de Jonge, B.L., Alm, R.A., Brown E.D., Uria-Nickelsen, M., Noonan, B., Mills, S.D., Tummino, P., Carmel, G., Guild, B.C., Moir, D.T., Vovis, G.F. and Trust, T.J. (1999) *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. **Microbiol Mol Biol Rev**. 63 (3): 675-707.
- Doig, P. and Trust, T. (1994) Identification of surface-exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. **Infect Immun**. 62: 4526-4533.
- Dubois, A. (1995) Spiral bacteria in the human stomach: The gastric *helicobacters*. **Emerg Infect Dis** 1: 79-85.
- Dunn, B., Campbell, G., Pérez-Pérez, G. and Blaser, M. (1990) Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem** 265: 9464-9469.
- Dunn, T., Gable, K. and Beeler, T. (1994) Regulation of cellular Ca<sup>2+</sup> by yeast vacuoles. **J Biol Chem** 269: 7273-78.
- Eaton, K.A. (1992) Motility is a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. **J Med Microbiol**. 37: 123-127.
- Eaton, K.A., Catrenich, C.E. and Makin, K.M. (1995) Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **J Infect Dis**. 171: 459-462.
- Edwards, G., Nakamoto, H., Burnell, J. and Hatch, M. (1985) Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C<sub>4</sub> photosynthesis: properties and mechanism of light dark regulation. **Annu Rev Plant Physiol**. 36: 255-286.
- Elitsur, Y., Hill, I., Lichtman, S.N. and Rosenberg, A.J. (1998) Prospective comparison of rapid urease test (Pylory Tek, CLO test) for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic children: a pediatric multicenter study. **Am J Gastroenterol**. 93: 217-219.
- Ernst, P., Crowe, S and Reyes, V. (1997) How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage?. The inflammatory response. **Gastroenterology**. 113 (Supp 6): S35-S42.
- Evans, D., Evans, Jr. D., Moulds, J. and Graham, D. (1988) N-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori* : a putative colonization factor antigen. **Infect Immun** 60: 2896-2906.
- Evans, D.J.Jr., Evans, D.G., Lampert, H.C. and Nakano, H. (1995). Identification of four new prokaryotic bacterioferritins, from *Helicobacter pylori*, *Anabaena variabilis*, *Bacillus subtilis* and *Treponema pallidum*, by analysis of gene sequences. **Gene** 153: 123-127.
- Evans, H. and Wood, H. (1968) The mechanism of pyruvate, phosphate dikinase reaction. **Proc Natl Acad Sci USA**. 61: 1441-1453.

- Fabiato, A. (1988) Computer programs for calculating total from specified free or free specified total ionic in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. **Methods Enzimol.** 157: 378-416.
- Ferguson, K.A. (1964) **Metabolism.** 13: 985-1002.
- Ferrero, R.L. Hazell, S.L., Lee, A. (1988) The urease enzymes of *Campylobacter pylori* and a related bacterium. **J Med Microbiol** 27: 33-40.
- Finel, M. (1998) Does NADH play a central role in energy metabolism in *Helicobacter pylori*?. **Trends Biochem Sci.** 23: 412-414.
- Fox, J.G., Correa, P., Taylor N.S., Lee, A., Otto, G., Murphy, J.C. and Rose, R. (1990) *Helicobacter mustelae*-associated gastritis in ferrets: an animal model of *Helicobacter pylori* gastritis in human. **Gastroenterology.** 99: 352-361.
- Fox, J.G., Yan, L.L., Dewhirst, F.E. *et al.* (1995) *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers and intestines of aged, inbred mice. **J Clin Microbiol.** 33: 445-454.
- García-Horsman, J.A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. and Gennis, R.B. (1994) The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. **J Bacteriol.** 176: 5587-5600.
- Ge, Z., Hiratsuka, K., and Taylor, D. (1995) Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two *Helicobacter pylori* genes encode a P-type ATPase and cation-binding protein associated with copper transport. **Mol Microbiol.** 15 (1): 97-106.
- Go, M.F. and Graham, D.Y. (1994) How does *Helicobacter pylori* cause duodenal ulcer disease: the bug, the host, or both?. **J Gastroenterol Hepatol (suppl)** 9: 8-12.
- Goodwin, C., Armstrong, J., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M., Sly, L., McConnell, W. and Harper, W. (1989) Transfer *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nv. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. **Int J System Bacteriol** 39: 397-405.
- Goodwin, C.S., Collins, M.D. and Blincow, E. (1986) The absence of theroplasmaquinones in *Campylobacter pyloridis*, and its temperature and pH growth range. **Microbios Lett** 32: 137-40.
- Graham, D. (1998) Complete genomic sequence of *Helicobacter pylori*: implications for the clinician. In **Current opinion in gastroenterology.** Edited by Malfertheiner, P., Mégraud, F., Michetti, P. and Price, A. 14 (Supp 1): S7-S8.
- Graham, D., Klein, P., Evans, Jr. D.J. *et al.* (1987) *Campylobacter pylori* detected non-invasively by the <sup>13</sup>C-urea breath test. **Lancet.** 11: 1172-1174.
- Graham, D., Malaty, H., Evans, D., Evans, Jr., D., Klein, P. and Adam, E. (1990) Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race and socioeconomic status. **Gastroenterology** 100: 1495-1501.
- Graham, D., Opekun, A. and Klein P. (1993) Clarithromycin for the eradication of *H. pylori*. **J Clin Gastroenterol** 16: 292-4.
- Guamer, J., Mohar, A., Parsonnet, J. and Halperin, D. (1993) The association of *H. pylori* with gastric cancer and preneoplastic gastric lesions in Chiapas, México. **Cancer** 71: 297-30.
- Haas, R., Meyer, T. And van Putten, J. (1993) Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. **Mol Microbiol.** 8: 753-760.
- Hachimori, A., Takeda, A., Kaibuchi, M., Ohkawara, N. and Samejima, T. (1975) Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from *Bacillum stearothermophilus*. **J Biochem.** 77: 1177-1183.
- Hachimori, A., Shiroya, Y., Hirato, A., Miyahara, T. Samejima, T. (1979) **J Biochem.** (Tokyo) 86: 121-130.
- Hatch, M. and Slack, C. (1968) A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in C<sub>4</sub> dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. **Biochem J.** 106: 141-146.
- Hazell, S., Evans, D. and Graham, D. (1991) *Helicobacter pylori* catalase. **J Gen Microbiol** 137: 57-61.
- Hazell, S., Lee, A., Brady, L. and Hennessy, W. (1986) *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. **J Infect Dis** 153: 658-63.

- Hazell, S. and Mendz, G. (1997) How *Helicobacter pylori* works: an overview of the metabolism of *Helicobacter pylori*. **Helicobacter** 2 (1): 1-12.
- Hedrick, J.L., Smith, A.J. (1968) Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. **Arch Biochem Biophys** 126: 155-164.
- Hoffman, P.S., Goodwin, A., Johnsen, J., Mgee, K., Veldhuyzen, S.J. and Vanzanten, S.J. (1996) Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlated with resistance. **J Bacteriol.** 178:4822-4829.
- Hornick, R. (1987) Peptic ulcer disease: a bacterial infection?. **N Engl J Med** 316: 1598-1600.
- Hsieh, P.-C., Shenoy, B., Jentoft, J. and Phillips, N. (1993) Purification of polyphosphate and ATP glucose phosphotransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra: Evidence that poly P and ATP glucokinase activities are catalyzed by the same enzyme. **Protein Exp Purif** 4: 76-84.
- Hughes, N.J., Clayton, C.L., Chalk, P.A. and Kelly, D.J. (1998) The *porCDAB* and *oorDABC* genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP. **J Bacteriol.** 180: 1119-1128.
- Hughes, N.J., Chalk, P.A., Clayton, C.L. and Kelly, D.J. (1995) Identification of carboxylation enzymes and characterization of a novel four-subunit pyruvate-flavodoxin oxidoreductase from *Helicobacter pylori*. **J Bacteriol** 177: 3953-59.
- Husson, M.O., Legrand, D., Spik, G. and Leclerc, H. (1993) Iron acquisition by *Helicobacter pylori* - importance of human lactoferrin. **Infect Immun** 61: 2694-7.
- Jetten, M.S., Fluit, T.J., Stams, A.J. and Zehnder, A.J. (1992) A fluoride-insensitive inorganic pyrophosphatase isolated from *Methanothrix soehngenii*. **Arch Microbiol.** 157: 284-289.
- Johensans, C., Labigne, A. and Suerbaum, S. (1995) Comparative ultrastructure and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. **J Bacteriol.** 177: 3010-3020.
- Jones, A.C., Foyne, S., Cockayne, A. and Penn, C.W. (1996) Gene cloning of a flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori* shows its identity with the putative adhesin, HpaA. **Gut.** 39 (Supp 2) A62.
- Jones, D., Curry, A. and Fox, A. (1985) An ultra-structural study of gastric *Campylobacter*-like organism "*C. pyloridis*". **J Gen Microbiol.** 131: 2335-2341.
- Josse, J. (1966) Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and catalytic properties. **J Biol Chem.** 241: 1938-1947.
- Keasling, J., Bertsch, L. and Kornberg, A. (1993) Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. **Proc Natl Acad Sca USA.** 90: 7029-33.
- Kelly, D.J. (1998) The physiology and metabolism of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Adv Microb Physiol.** 40: 137-189.
- Keltjens, J., van Erp, R., Mooijart, R., van der Drift, Ch. and Vogels, G. (1988) Inorganic pyrophosphate synthesis during methanogenesis from methylenzyme M by cell-free extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain AH). **Eur J Biochem.** 172: 471-476.
- Kim, M.J., Michener, R. and Triadafilopoulos, G. (1997) <sup>13</sup>C-bicarbonate assay for the diagnosis of gastric *Helicobacter pylori* infection and response to treatment. **Gastroenterology.** 113: 31-32.
- Klemme, J. and Gest, H. (1971) Regulation of the cytoplasmic inorganic pyrophosphatase of *Rs. rubrum*. **Eur J Biochem** 22: 529-37.
- Kornberg, A. (1957) Pyrophosphorylases and phosphorylases in biosynthetic reactions. in *Advances in Enzymology* Vol.18 (Ed. F.F. Nord) pp 191-240. Interscience, New York.
- Kornberg, A. (1995) Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. **J Bacteriol** 177: 491-496.
- Kornberg, SR. (1957) Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from *Escherichia coli*. **Biochem Biophys Acta** 26: 294-300.
- Kulaev, IS. (1979) The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley and Sons., Inc. New York.
- Kulaev, IS., Vagabov, V. and Shabalina, Y. (1987) New data on biosynthesis of polyphosphates in yeast, pp 233-238. In Torriani-Gorini, A., Rothman, F., Silver, S., Wright, A. and Yagil, E. (Ed) *Am Soc Microbiol*, Washington, DC.

- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227: 680-685.
- Lahti, R. (1983) Microbial inorganic pyrophosphatases. **Microbiol Rev** 47: 169-79.
- Lahti, R. and Niemi, T. (1981) Purification and some properties of inorganic pyrophosphatase from *Streptococcus faecalis*. **J Biochem**. 90:79-85.
- Lawson, J.W. and Veech, R. (1979) Effects of pH and free  $Mg^{2+}$  on the  $K_{eq}$  of the creatine kinase reaction and other phosphate hydrolysis and phosphate transfer reactions. **J Biol Chem**. 254: 6528-6537.
- Lee, A. (1996) Vaccination against *Helicobacter pylori*. **J Gastroenterol**. 31: 69-79.
- Lee, A. and Chen, M. (1994) Successful immunization against gastric infection with *Helicobacter pylori* use of cholera toxin B-subunit whole-cell vaccine. **Infect Immun**. 62: 3594-3597.
- Lee, A., Fox, J., Otto, G., Dick, E. and Krakowka, S. (1991). Transmission of *Helicobacter* spp: a challenge to the dogma of faecal-oral spread. **Epidemiol Infect** 107: 99-109.
- Lee, A., Fox, J., Otto, G. and Murphy, J. (1990) A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. **Gastroenterology**. 99: 1315-1323.
- Lee, A., Fox, J. and Hazell, S. (1993) Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. **Infect Immun** 61 : 1601-10.
- Lee, R., Hartman, P. Stahr, H., Olson, D. and Williams, F. (1994) Antibacterial mechanism of long-chain polyphosphate in *Staphylococcus aureus*. **J Food Prot** 57: 289-94.
- Logan, R., Gummert P., Schaufelberger, H. et al. (1994) Eradication of *Helicobacter pylori* with clarithromycin and omeprazole. **Gut** 35: 323-6.
- López, G. (1992) Gastritis. **Medicine** 6: 73-85.
- Loreny, B., Batel, R., Bachinski, N., Muller, W. and Schroeder, H. (1995) Purification and characterization of two exopolyphosphatases from the marine sponge *Tethya lyncunum*. **Biochim Biophys Acta**. 1245 (1): 17-28.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem** 193: 265-275.
- Maier, R.J., Fu, C., Gilbert, J., Moshiri, F., Olson, J. and Plaut, A.G. (1996) Hydrogen uptake hydrogenase in *Helicobacter pylori*. **FEMS Microbiol Lett**. 141: 71-76.
- Mansurova, S. (1989) Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. **Biochim Biophys Acta**. 977: 237-247.
- Mansurova, S., Shakhov, Yu. P. and Kulaev, I. (1975) Synthesis of inorganic pyrophosphate by animal tissue mitochondria. **FEBS Lett**. 55: 94-8.
- Marais, A., Mendz, G.L., Hazell, S.L. and Mégraud, F. (1999) Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. **Microbiol Mol Biol Rev**. 63 (3): 642-674.
- Marcellini, S.W., Chang, H.T., Chapman, T., Chalk, P.A., Miles, R.J. and Poole, R.K. (1996) The respiratory chain of *Helicobacter pylori* - identification of cytochromes and the effects of oxygen on cytochrome and menaquinone levels. **FEMS Microbiol Lett** 138: 59-64.
- Marshall, B. and Goodwin, C. (1987) Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. **Int. J. Sys. Bacteriol**. 37: 68.
- Marshall, B. and Warren, J. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. **Lancet** i: 1311-5.
- Martell, A. and Sillén, L. (1971) Stability constants of metals ion complexes. Supplement No. 1. Special publication No. 25. The Chemical Society, London.
- Matin, A., Zychlinsky, E., Keyhan, M. and Sachs, G. (1996) Capacity of *Helicobacter pylori* to generate ionic gradients at low pH is similar to that of bacteria which grow under strongly acidic conditions. **Infect Immun** 64: 1434-36.
- Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. **J Biol Chem**. 262: 10035-10038.
- Matthews, P., Williams, S., Seymour, A., Schwartz, A., Dube, G., Gadian, D. and Radda, G. (1982) A  $^{31}P$ -NMR study of some metabolic and functional effects of the inotropic agents epinefrine and ouabain, and the ionophore RO2-2985 (X537A) in the isolated perfused rat heart. **Biochim Biophys Acta**. 720: 163-171.

- Mauch, F., Bode, G., Ditschuneit, H. and Malfertheiner, P. (1993) Demonstration of a phospholip-rich zone in the human gastric epithelium damaged by *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**. 105: 1698-1704.
- McColl, K.E., El-Nujumi, A., Murria, L., El-Omar, E., Guillen, D., Dickson, A. *et al.* (1997) The *Helicobacter pylori* breath test: a surrogate marker for peptic ulcer disease dyspeptic patients. **Gut**. 40: 302-306.
- McNulty, C. and Dent, J. (1987) Rapid identification of *Campylobacter pylori* (*C. pyloridis*) by performed enzymes. **J Clin Microbiol** 25: 1683-86.
- Melchers, K., Weitzenegger, T., Buhmann, A., Steinhilber, W., Sachs, G. and Schäfer, K. (1996) Cloning and membrane topology of a P type ATPase from *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem** 271: 446-57.
- Menz, G. and Hazell, S. (1991) Evidence for a pentose phosphate pathway in *Helicobacter pylori*. **FEMS Microbiol Letters** 84: 331-36.
- Menz, G., Hazell, S. and Burns, B. (1993) Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. **J Gen Microbiol** 139: 3023-28.
- Menz, G. and Hazell, S. (1993a) Glucose phosphorylation in *Helicobacter pylori*. **Arch Biochem Biophys** 300: 522-25.
- Menz, G. and Hazell, S. (1993b) Fumarate catabolism in *Helicobacter pylori*. **Biochem Mol Biol Int.** 31: 325-332.
- Menz, G.L., Hazell, S.L. and Burns, B.P. (1994a) The Entner- Doudoroff pathway in *Helicobacter pylori*. **Arch Biochem Biophys** 312: 349-56.
- Menz, G.L., Hazell, S.L. and Vanjorkom, L. (1994b) Pyruvate metabolism in *Helicobacter pylori*. **Arch Microbiol** 162: 187-92.
- Menz, G.L., Jimenez, B.M., Hazell, S.L., Gero, A.M. and O'Sullivan, W.J. (1994c) Salvage synthesis of pyrimidine nucleotides by *Helicobacter pylori*. **J Appl Bacteriol** 77: 1-8.
- Menz, G.L., Jimenez, B.M., Hazell, S.L., Gero, A.M. and O'Sullivan, W.J. (1994d) Salvage synthesis of purine nucleotides by *Helicobacter pylori*. **J Appl Bacteriol** 77: 674-81.
- Menz, G.L. and Hazell, S.L. (1995) Amino acid utilization by *Helicobacter pylori*. **Int J Biochem Cell Biol** 27: 1085-93.
- Menz, G.L., Burns, B.P. and Hazell, S.L. (1995a) Characterisation of glucose transport in *Helicobacter pylori*. **Biochim Biophys Acta** 1244: 269-76.
- Menz, G.L., Hazell, S.L. and Srinivasan, S. (1995b) Fumarate reductase - a target for therapeutic intervention against *Helicobacter pylori*. **Arch Biochem Biophys** 321: 153-9.
- Menz, G.L. and Hazell, S.L. (1996) The urea cycle of *Helicobacter pylori*. **Microbiology** 142: 2959-67.
- Meyer, W., Moll, R., Kath, Th. and Schäfer, G. (1995) Purification, cloning, and sequencing of archaeobacterial pyrophosphatase from the extreme thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*. **Arch Biochem Biophys**. 319: 149-156.
- Mitchell, H., Li, Y., Hu, P., Liu, Q., Chen, M., Du, G., Wang, Z., Lee, A. and Hazell, S. (1992) Epidemiology of *Helicobacter pylori* in Southern China - identification of early childhood as the critical period for acquisition. **J Infect Dis** 166: 149-153.
- Mobley, H.L.T. (1996) Defining *Helicobacter pylori* as a pathogen: strain heterogeneity and virulence. **Am J Med** 100: 2S-11S.
- Mobley, H.L.T. (1997) *Helicobacter pylori* factors associated with disease development. **Gastroenterology** 113: S21-S28.
- Mobley, H.L.T., Island, M.D. and Hansinger, R.P. (1995) Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol Rev** 59: 451-80.
- Morgan, D., Freedman, R., Depew, C. and Kraft, W. (1987) Growth of *Campylobacter pylori* in liquid media. **J Clin Microbiol**. 25(11): 2123-2125.
- Morris, A. and Nicholson, G. (1987) Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. **Am J Gastroenterology** 82: 192-9.



- Moshkowitz, M., Gorea, A., Arber, N., Konokoff, F., Berger, S. and Gilat, T. (1994) Morphological transformation of *Helicobacter pylori* during prolonged incubation. Association with decreased acid resistance. **J Clin Path.** 47: 172-174.
- Moss, C.W., Lambert-Fai, M.A., Nicholson, M.A. and Guerrant, G.O. (1990) Isoprenoid quinones of *Campylobacter cryaerophila*, *C. cinaedi*, *C. fennelline*, *C. hyointestinalis*, *C. pylori* and *C. upsaliensis*. **J Clin Microbiol** 28: 395-7.
- Moss, S. and Calam, J. (1992) *Helicobacter pylori* and peptic ulcers: the present position. **Gut.** 33:289-292.
- Nagata, K., Tsukita, S., Tamura, T. and Sore, N. (1996) A *cb*-type cytochrome-*c* oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*. **Microbiology** 142: 1757-63.
- Nedenskov, P. (1994) Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. **Appl Environ Microbiol** 60(9): 3450-3453.
- Noegel, A. and Gotschlich, E.C. (1983) Isolation of a high molecular weight polyphosphate from *Neisseria gonorrhoeae*. **J Exp Med.** 157: 2049-2060.
- Nomura, A., Stemmermann, G., Chyou, P., Kato, I., Pérez-Pérez, G. and Blaser, M. (1991) *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. **N Eng J Med** 325: 1132-1136.
- Nyren, P., Nore, B. and Strid, A. (1991) Proton-pumping N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: purification, characterization and reconstitution. **Biochemistry** 30: 2883-87.
- O'Connor, H.J. (1994) The role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **Scand J Gastroenterol.** 29: 11-15.
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R., Morris, N.R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Anal Biochem** 105: 361-363.
- Olivieri, R., Bugnoli, M., Armellini, D., Bianciardi, S., Rappuoli, R., Bayeli, P.F., Abate, L., Esposito, E., Degregorio, L., Asís, J., Basagni, C. And Figura, N. (1993) Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins.. 31:160-162.
- Ottlecz, A., Romero, J.J. Hazell, S.L., Graham, D.Y. and Lichtenberger, L.M. (1993) Phospholipase activity by *Helicobacter pylori* and its inhibition by bismuth salts - biochemical and biophysical studies. **Dig Dis Sci** 38: 2071-80.
- Parsonnet, J., Friedman, G., Vandersteen, D., Chang, Y., Vogelman, J., Orentreich, N. and Sibley, R. (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **N Engl J Med** 325: 1127-31.
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodríguez, L., Gelb, A.B., Wornke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J.H. and Friedman, G.D. (1994) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. **N Engl J Med** 330: 1267-1271.
- Peek, R., Miller, G., Tham, K., Pérez-Pérez, G., Cover, T., Dunn, D. and Blaser, M. (1994) Detection of *cagA* expression in vivo and demonstration of preferential cytokine expression by *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* strains in gastric mucosa. **Am J Gastroenterology** 89: 1344-
- Pérez-Pérez, G., Dworkin, B., Chodos, J. and Blaser, M. (1988) *Campylobacter pylori* antibodies in humans. **Ann Inter Med** 109:11-17.
- Pick, U. and Weiss, M. (1991) Polyphosphate hydrolysis within acidic vacuoles in response to amine-induced alkaline stress in halotolerant alga *Dunaliella salina*. **Plant Physiol** 97: 1234-40.
- Piotrowski, J., Morita, M., Slomiany, A. and Slomiany, B. (1992) Inhibition of gastric mucosal laminin receptor by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Effect of ebrotidine. **Biochem Int** 27: 131-38.
- Pitson, S.M., Mendz, G.L., Srinivasan, S. And Hazell, S. L. (1999) The tricarboxylic acid cycle of *Helicobacter pylori*. **Eur J Biochem.** 260: 258-267.
- Rea, P., Kim, Y., Sarafian, V., Poole, R., Davis, J. and Sanders, D. (1992) Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase: a new category of ion translocase. **Trends Biochem Sci** 17: 348-352.
- Reeves, R. (1968) A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. **J Biol Chem.** 243: 3202-3204.

- Reusch, R. and Sadoff, H. (1988) Putative structure and functions of a poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. **Proc Natl Acad Sci USA** 85: 4176-80.
- Reusch, R., Huang, R. and Bramble, L. (1995) Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the plasma membranes of *Escherichia coli*. **Biophys J** 69: 754-66.
- Reynolds, D.J. and Penn, C.W. (1994) Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. **Microbiology UK** 140: 2649-56.
- Richter, O.M. and Schäfer, G. (1992) Purification and enzymic characterization of cytoplasmic pyrophosphatase from the thermoacidophilic archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. **Eur J Biochem.** 209: 343-349.
- Robinson, N. Clark, J. and Wood, H. (1987) Polyphosphate kinase from *Propionibacterium shermanii*. **J Biol Chem** 262: 5216-22.
- Romero, I., Gómez-Priego, A., Celis, H. (1991) A membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes of *Rhodospirillum rubrum*. **J Gen Microbiol** 137: 2611-2616.
- Salmela, K.S., Roine, R.P., Hooknikanne, J., Kosunen, T.U. and Salaspuro, H. (1994) Acetaldehyde and ethanol production by *Helicobacter pylori*. **Scand J Gastroenterology** 29: 309-12.
- Salmela, K.S., Roine, R.P., Koivisto, T., Hooknikanne, J., Kosunen, T.U. and Salaspuro, H. (1993) Characteristics of *Helicobacter pylori* alcohol dehydrogenase. **Gastroenterology** 105:325-30.
- Schägger, H., Link, Th.A., Engel, W.D., von Jagow, G. (1986) Isolation of the eleven proteins subunits of the  $\text{bc}_1$  complex from beef heart. **Meth Enzymol** 126: 224-237.
- Schwarm, H-M., Vogenschow, H. and Knoblock, K. (1986) Purification and properties of a soluble inorganic pyrophosphatase from *Rhodopseudomonas palustris*. **Biol Chem Hoppe-Seyler.** 367:119-126.
- Sitas, F., Forman, D., Yarnell, J., Burr, M., Elwood, P., Pedley, Marks, K. (1991) *Helicobacter pylori* infection rates in relation to age and social class in a population of Welsh men. **Gut** 32 : 25-28.
- Skorko, R. (1989) Polyphosphate as a source of phosphoryl group in protein modification in the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. **Biochimie** 71: 1089-93.
- Slomiany, B.L. and Slomiany, A. (1992) Mechanis of *Helicobacter pylori* pathogenesis: focus on mucus. **J Clin Gastroenterol.** 14 (Supp1) S114-S121.
- Smith, M.A., Finel, M., Korolik, V. and Mendz, G.L. (2000) Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. **Arch Microbiol.** 174: 1-17.
- Sörberg, M., Nilsson, M., Hanberger, H. and Nilsson, L.E. (1996) Morphological conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccid form. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 15: 216-219.
- Stackerbrandt, E., Murray, R. and Truper, G. (1988) Proteobacteria classis nov. a novel name for the phylogenetic taxon that includes the purple bacteria and their relatives. **Int J Syst Bacteriol.** 38: 321-325.
- Stanley, J., Linton, D., Burnens, A.P., Dewhirst, F.E., Owen, R.J., Porter, A., On, S.L.W. and Costas, M. (1993) *Helicobacter pylori* canis sp. Nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. **J Gen Microbiol.** 139: 2495-2505.
- Sui, P. and Wood, H. (1962) Phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase, a  $\text{CO}_2$  fixation enzyme from propionic acid bacteria. **J Biol Chem.** 237: 3044-3051.
- Sumner, J.B. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorous. **Science** 100: 413-415.
- Tarkkanen, J., Kosunen, T. and Saksela, E. (1993) Contact of lymphocytes with *Helicobacter pylori* augments natural killer cell activity and induces production of interferon. **Infect Immun** 61: 3012-6.
- Taylor, D. and Blaser, M. (1991) The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Epidemiol Rev** 13: 42-59.
- Tinsley, C., Manjula, B. and Gotschlich, E. (1993) Purification and characterization of polyphosphate kinase from *Neisseria meningitidis*. **Infect Immun** 61: 3703-10.

- Tomb, J-F, White, O, Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J.D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley, J.M., Cotton, M.D., Weidman, J.M., Fujii, C., Bowman, Ch., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M., Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547.
- Tominaga, N. and Mori, T. (1977) Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from *Thiobacillus thiooxidans*. *J Biochem.* 81: 477-483.
- Tono, H. and Kornberg, A. (1967) Biochemical studies of bacterial sporulation. III. Inorganic pyrophosphatase of vegetative cells and spores of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* 242: 2375-2382.
- Tummuru, M., Cover, T. and Blaser, M. (1993) Cloning and expresion of a high molecular-mass-major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to citotoxine production. *Infect Immun* 61: 1799-1809.
- Vaira, D., Menegatti, M., Acciardi, C., Landi, F., Ricci, C., Massardi, B. *et al.* (1998) A novel "antigen" assay based on stool specimens for detection and the follow-up of *Helicobacter pylori*. Preliminary report [abstract]. *Gastroenterology*. A:928.
- van Alebeek, G-J., Keltjens, J.T. and van der Drift, C. (1994) Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain  $\Delta H$ ) *Biochem Biophys Acta.* 1206: 231-239.
- van Zwet, A.A. and Mégraud, F. (1998) Diagnosis. In **Current opinion in Gastroenterology**. Edited by Malfertheiner, P., Mégraud, F., Michetti, P. and Price, A. 14 (Supp 1): S27-S33.
- Verhoeven, J.A., Schenck, K.M., Meyer, R.R. and Trela, J.M. (1986) Purification and characterization of an inorganic pyrophosphatase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 168: 318-321.
- Voelz, H., Voelz, U. and Ortigoza, R. (1966) The "polyphosphate overplus" phenomenon in *Myxococcus xanthus* and its influence on the architecture of the cell. *Arch Mikrobiol* 53: 371-88.
- Warren, J. and Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 2: 1273-1275.
- West, A.P., Millar, M.R. and Tompkins, D.S. (1990) Survival of *Helicobacter pylori* in water and saline. *J Clin Path.* 43:609.
- Westblom, T., Madan, E. and Midkiff, B. (1991) Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 29: 819-21.
- Whitaker, J. (1963) Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal Chemistry.* 35 (12): 1950-53.
- Williams, C.L., Preston, T., Hossack, M., Slater, C. and McColl, K. (1996) *Helicobacter pylori* utilises urea for amino acid synthesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 13: 87-94.
- Woese, C.R. *et al.* (1990) *Proc Natl Acad Sci, USA.* 87: 4576-4579.
- Wong, S.C., Hall, D.C. and Josse, J. (1970) Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. III. Molecular weight and physical properties of the enzyme and its subunits. *J Biol Chem.* 245:4335-4345.
- Wood, H. (1977) Some reactions in which inorganic pyrophosphate replaces ATP and serves as a source of energy. *Fed Proc.* 36:2197-2205.
- Wood, H. (1985) Inorganic pyrophosphate and polyphosphates as sources of energy, *Curr Top Cell Reg* 26: 355-69.
- Wood, H. (1987) Phosphate reserves and energy storage:pyrophosphates. in Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. (Ed) Torriani-Gorini, A., Rothman, F., Silver, S., Wright, A. and Yagil, E. Am Soc Microbiol, Washington, DC. pp. 245-246.

- Vood, H. and Clark, E. (1988) Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu Rev Biochem* 57: 235-260.
- Vorst, D.J., Otto, B.R. and Degraaff, J. (1995) Iron-repressible outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* involved in heme uptake. *Infect Immun* 63: 4161-5.
- Votherspoon, A.C., Doglioni, C., Diss, T.C., Pan, L., Moschim, A., de Boni, M. and Isaacson, P.G. (1993) Regression of primary low-grade B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 342: 575-577.
- Vurst, H. and Kornberg, A. (1994) A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 10996-11001.
- Vyatt, J.I., Rathbone, B.J., Dixon, M.F. and Heatley, R.V. (1987) *Campylobacter pyloridis* and acid-induced metaplasia in the pathogenesis of duodenitis. *J Clin Pathol*. 40: 841-848.
- Young, T.W., Kuhn, N.J., Wadeson, A., Ward, S., Burges, D and Cooke, D. (1998) *Bacillus subtilis* ORF *yybQ* encodes a manganese-dependent inorganic pyrophosphatase with distinctive properties: the first of a new class of soluble pyrophosphatase?. *Microbiology*. 144: 2563-2571.
- Zweier, J. and Jacobus, W. (1987) Substrate-induced alterations of high energy phosphate metabolism and contractile function in the perfused heart. *J Biol Chem*. 262: 8015-8021.

**VII. ANEXO.**

Oliva, G., Romero, I., Ayala, G., Barrios-Jacobo, I. and Celis, H. (2000) Characterization of the inorganic pyrophosphatase from the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. **Arch Microbiol.** 174: 104-110.

Guadalupe Oliva · Irma Romero · Guadalupe Ayala  
Idanelli Barrios-Jacobo · Heliodoro Celis

## Characterization of the inorganic pyrophosphatase from the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*

Received: 29 March 2000 / Revised: 16 May 2000 / Accepted: 16 May 2000 / Published online: 5 July 2000

© Springer-Verlag 2000

**Abstract** A cytoplasmic pyrophosphatase [E.C. 3.6.1.1.] was partially purified from *Helicobacter pylori*. The molecular mass was estimated to be 103 kDa by gel filtration. Results of SDS-PAGE suggested that the enzyme consists of six identical subunits of 19.1 kDa each. The enzyme specifically catalyzed the hydrolysis of pyrophosphate and was very sensitive to NaF, but not to sodium molybdate. The optimal pH for activity was 8.5.  $Mg^{2+}$  was required for maximal activity;  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$  poorly supported hydrolytic activity. The pyrophosphatase had an apparent  $K_m$  for  $Mg\text{-}PP_i^{2-}$  hydrolysis of 90  $\mu M$ , and a  $V_{max}$  estimated at 24.0  $\mu mol P_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

**Key words** Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase · *Helicobacter pylori* · Fluoride sensitivity

**Abbreviation** PPase Pyrophosphatase

### Introduction

*Helicobacter pylori* is a gram-negative, microaerophilic bacterium that is now recognized as the principal etiological agent of human chronic gastritis (Marshall and Warren 1984). It is also associated with peptic ulcers (Hornick 1987) and has been linked to the development of gastric

cancer (Parsonnet et al. 1991) and, more recently, to heart disease (Mendall et al. 1994).

There is a severe lack of information regarding the metabolism of *H. pylori*. This bacterium can use glucose as a source of carbon and energy. The discovery of enzymes of the pentose pathway and glucokinase activity confirms that glucose can be utilized by this pathway. Moreover, in experiments in which radioactively labeled glucose was used as tracer, label was incorporated into lactate (Mendz et al. 1993). Other enzyme activities such as cytochrome oxidase, catalase,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase, and DNase have been reported (Megraud 1989); the gene encoding a P-type ATPase has been cloned (Melchers et al. 1996). The energy requirements of *H. pylori* are largely unknown and its key enzymes have not yet been described. In order to understand more clearly how this bacterium utilizes various energy sources, we investigated the pyrophosphatases (PPases) of this microorganism.

$PP_i$  is the simplest compound containing a phosphoanhydride bond and, in some cases, it can substitute for ATP (Wood 1977). Inorganic PPases [E.C.3.6.1.1.] are widely distributed in living cells and carry out the hydrolysis of  $PP_i$  to  $P_i$ . In many organisms, the bulk of pyrophosphatase (PPase) activity is soluble, localized in the cytosol and serves to hydrolyze the  $PP_i$  that is released during biosynthetic reactions. These soluble PPases have been described from various sources. Some organisms possess membrane-associated PPases that are capable of utilizing the energy contained in the phosphoanhydride bond of  $PP_i$  to establish transmembrane ionic gradients. Notable examples of energy-transducing or energy-conserving PPases are the reversible  $H^+$ -translocating PPase of chromatophores from the purple non-sulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky 1978), the vacuolar  $H^+$ -translocating PPase of plant cells (Rea et al. 1992), and the membrane-associated PPase of animal and yeast mitochondria (Mansurova 1989).

Here, we report the isolation and characterization of the cytoplasmic PPase of *H. pylori* and compare its properties with those of PPases from other organisms.

G. Oliva · H. Celis (✉)  
Instituto de Fisiología Celular,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apartado Postal 70-243, 04510, México, D.F., Mexico  
e-mail: hcelis@ifisiol.unam.mx,  
Tel.: +52-5-6225667. Fax: +52-5-6225611

I. Romero  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
04510, México, D.F., Mexico

G. Ayala · I. Barrios-Jacobo  
Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas,  
Instituto Nacional de Salud Pública,  
Avenida Universidad 655,62508 Cuernavaca, Morelos, Mexico

## Materials and methods

### Growth of bacteria

*Helicobacter pylori* strain 8823 (ATCC 49503) was a kind gift of Martin J. Blaser (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tenn.). Bacteria were grown on blood agar plates on CO tryptic soy agar supplemented with 5% sheep blood) with vancomycin/ml under a microaerobic atmosphere (10% v/v at 37°C for 48 h. For large-scale liquid cultures, the material used from one plate was inoculated into 30 ml of Brucella broth (BBL Becton Dickinson), in a Falcon tube with *H. pylori* serum supplement (OXOID SR147E) and 10% fetal bovine serum. The culture was allowed to grow under the same conditions with gentle shaking, and harvested after 48 h by centrifugation (1000×g for 10 min). The pellet obtained was checked for purity for the presence of catalase, oxidase, and urease activities. Gram staining was used to ascertain morphology and stain characteristics. The pellet was then used to inoculate a 250-ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of Brucella broth supplemented with 10% fetal bovine serum. The bacteria were then grown as before and harvested by centrifugation after 48 h.

### Preparation of cell-free extracts and membrane fraction

Harvested cells were washed twice by centrifugation (1000×g, 20 min) in 20 mM Tris-HCl, pH 8.6, plus 10 mM MgCl<sub>2</sub> to eliminate all glycerol present in the cells. For ultrasonic lysis of the cells, they were resuspended (1/6 w/v) in the same buffer with 200 U of DNase/50 ml buffer, and cells were sonicated in 5-ml aliquots for 3 min on ice. After centrifugation at 27,000×g for 20 min at 4°C, the supernatant was collected and centrifuged at 1000×g for 80 min at 4°C. The pellet, containing the membrane fraction, was resuspended in 20 mM Tris-HCl, pH 8.6, 1 mM MgCl<sub>2</sub>. PPase and ATPase activities were determined in the resuspended pellet and cytoplasmic PPase activity in the supernatant.

### Partial purification of cytoplasmic PPase

Partial purification of *H. pylori* cytoplasmic PPase was a modification of the procedure by Klemme and Gest (1971). Our method did not include the protamine sulfate step, and the fractionation step with ammonium sulfate was increased to 90% saturation. All steps except the Mono Q chromatography were carried out at 4°C. After ammonium sulfate fractionation, the dialyzed sample was loaded onto a Sephacryl S-200 column (1.5×70 cm), equilibrated and eluted with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5 (buffer A). Fractions with highest activity were pooled and loaded onto a ω-aminohexylagarose-PP, affinity-exchange column, and eluted with buffer A, buffer A plus 100 mM PPiNa, and again with buffer A. Bound protein was eluted with a gradient of 0–1 M NaCl in buffer A. Fractions containing PPase activity were dialyzed, concentrated, and applied to a FPLC Mono Q HR 5/5 anion-exchange column (Pharmacia) equilibrated with buffer A and eluted with a 60-ml gradient of 0–1 M NaCl in buffer A at a flow rate of 0.5 ml/min. Active fractions were pooled and dialyzed overnight against buffer A plus 1 mM MgCl<sub>2</sub>. The preparation was stored frozen at –20°C.

### N-terminal sequence analysis

FPLC-purified PPase was loaded onto a native polyacrylamide gel. The proteins were then transferred onto a ProBlott membrane at 100 mA for 2.5 h (4°C) in the presence of 10 mM CAPS (pH 11) and 10% methanol following the procedure of Matsudaira (1987). The membrane was stained with Coomassie blue R to locate the enzyme band, which was excised and subjected to N-terminal sequence analysis at the Laboratoire de Microséquence des Pro-

téins, Institute Pasteur, Paris, France by Dr. J. d'Alayer, on a 473 A Sequencer (Applied Biosystems).

### PPase and ATPase assays

PPase activity was measured by determining P<sub>i</sub> released during enzymatic hydrolysis. For PP<sub>i</sub> hydrolysis, the assays contained 50 mM Tris-maleate (pH 7.5 for the membrane PPase, and pH 8.5 for the cytoplasmic PPase), 2 mM NaPP<sub>i</sub>, and 3 mM MgCl<sub>2</sub>. For ATP hydrolysis, the assays contained 50 mM Tris-acetate, pH 8.0, 2 mM ATP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.45 μM phosphoenol pyruvate and 7 μg pyruvate kinase. Modifications of these conditions are indicated in the figure legends. The activity was carried out at 37°C using 100 μg membrane protein or 10 μg cytoplasmic protein. The reaction was stopped with trichloroacetic acid (final concentration 6%). Phosphate was determined in the supernatant by the methods of Sumner (1944) or Ames (1966). The second method was more sensitive and was used to determine K<sub>m</sub>. Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as standard.

### Gel electrophoresis and detection of enzyme activity in gels

Cytoplasmic PPase was analyzed by non-denaturing electrophoresis using the method of Davis (1964) on slab gels. To localize PPase activity in situ, gels were treated as described in Romero et al. (1991). Procedures for characterizing molecular weight isomers using non-denatured polyacrylamide gels were as in Hedrick and Smith (1968).

### Two-dimensional gel electrophoresis

In the first dimension, proteins were separated by 12% non-denaturing gel electrophoresis. For the second-dimension, lanes from the non-denaturing gels were incubated in 20 mM Tris-HCl (pH 6.8) and 1% β-mercaptoethanol for 5 min. The proteins were separated by SDS-16% polyacrylamide gel electrophoresis as described by Schägger et al. (1986). For the determination of subunit molecular mass, a plot of R<sub>f</sub> values vs molecular mass was constructed using the protein standards monomeric bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; G-3-P dehydrogenase, 36 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsinogen, 24 kDa; trypsin inhibitor, 20 kDa, and α-lactalbumin, 14 kDa. Protein was detected by silver staining as described by Oakley et al. (1980).

### Molecular mass estimation of the soluble PPase by gel filtration

The partially purified PPase (120 μg protein) was applied to a Sephacryl S-300 column (1×47.5 cm) equilibrated in 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) and 1 mM MgCl<sub>2</sub>. The flow rate was adjusted to 0.2 ml/min and proteins, collected in 0.5-ml fractions, were detected by absorbance at 280 nm and assayed for PPase activity. The column was calibrated with ferritin (440 kDa), yeast PPase (66 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa).

### Chemicals

All chemicals were of analytical grade and obtained from commercial sources.

## Results

### Intracellular localization

Inorganic PPase in bacteria is usually a cytoplasmic enzyme. However, in some bacteria such as *Rhodospirillum*

**Table 1** Partial purification of cytoplasmic PPase from *Helicobacter pylori*

Purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Specific activity [ $\mu\text{mol P}_i \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$ ]	Purification (-fold)
Crude extract	150	96.2	1.71	
Supernatant fluid from heat denaturation	140	53.5	2.09	1.2
Ammonium sulfate fraction	13	14.0	5.89	3.5
Sephacryl S-200	7	4.8	8.7	5.0
$\omega$ -Aminoethylagarose-PP <sub>i</sub>	3.2	0.134	33.1	19.3
Mono Q HR 5/5	1.96	0.024	141.7	82.8

*or*, PPase activity is observed in both soluble and membrane fractions. In order to locate the PPase activities in *Helicobacter pylori*, the membranes were separated from the soluble cell constituents by ultracentrifugation. The fresh membrane fraction contained low levels of PPase activity which was 88% inhibited by 5 mM sodium molybdate, suggesting that this activity is due to an unspecific phosphatase. In the soluble fraction significantly more PPase activity was recovered, which was completely inhibited by the PPases inhibitor NaF at 10 mM and insensitive to sodium molybdate. Some ATPase activity was detected in the membrane fraction but none was detected in the soluble fraction.

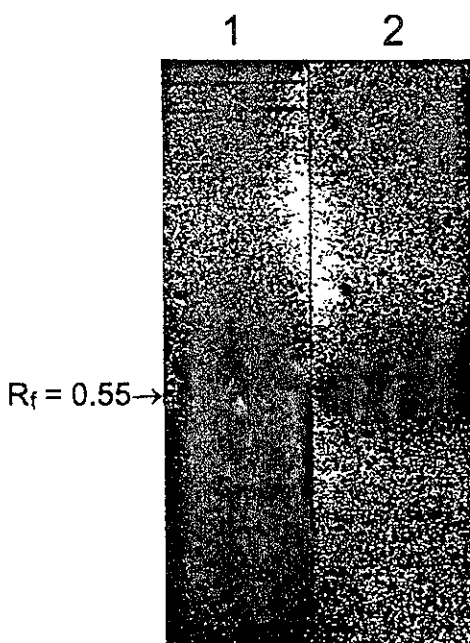
Partial purification of the cytoplasmic PPase of *H. pylori*, analysis by gel electrophoresis, and N-terminal sequence

Table 1 summarizes the results of a partial purification of the soluble *H. pylori* PPase using the procedure described in Materials and methods. The enzyme was purified 82.8-fold to a specific activity of  $141.7 \mu\text{mol P}_i \text{ min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$  after FPLC Mono Q purification. The enzyme lost 67% of its activity in 2 weeks when stored without divalent cations.

When the purified enzyme was analyzed by non-denaturing electrophoresis and silver staining, a dominant band was observed with an  $R_f$  value of 0.55 (Fig. 1, lane 1). When the gel was overloaded, four additional bands with lower mobility were observed. When an identical fragment was tested for enzyme activity by direct reaction in the gel with PP<sub>i</sub>, a single band of liberated P<sub>i</sub> was found with the same  $R_f$  value (Fig. 1, lane 2). Two-dimensional gel electrophoresis of the preparation showed the PPase to be composed of a monomer of 19.1 kDa (data not shown).

The N-terminal sequence of the PPase band, was M-N-E-K-L-E. This sequence is identical to the deduced N-terminal amino acid sequence of the PPase from *H. pylori* strain 26695, demonstrating that the band of  $R_f$  0.55 is the *H. pylori* cytoplasmic PPase.

Fractions eluted from the Sephacryl S-200 column were analyzed by native electrophoresis and stained for enzyme activity. Two zones of liberated P<sub>i</sub>, at  $R_f$  values of 0.4 and 0.55, were detected. Each of these bands, when analyzed by denaturing gel electrophoresis, gave single spots with the same molecular mass (~19 kDa), suggesting that they are oligomers of the same PPase monomer



**Fig. 1** Native polyacrylamide gel electrophoresis of the partial purified PPase of *Helicobacter pylori*. The active fraction eluted from the Mono Q column (4.6  $\mu\text{g}$  of protein) was analyzed on a 10% polyacrylamide slab gel, which was subsequently silver-stained (lane 1) or activity-stained (lane 2). For the activity stain, the gel was incubated at 37°C in 50 mM Tris-maleate, pH 8.5, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{NaPP}_i$ , for 30 min.

This band pattern was not altered when a cocktail of protease inhibitors [phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and *N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  each] were included during purification. By Ferguson plots analysis (data not shown), it was confirmed that the two bands are molecular weight isomers and not charge isomers of the enzyme. This indicates that an enzymatically active enzyme exists in several aggregation states.

#### Determination of the relative molecular mass of the native cytoplasmic PPase

The relative molecular mass of the native PPase was estimated by gel filtration on a Sephacryl S-300 column. The enzyme eluted at a position corresponding to  $V_e/V_0=1.51$ .



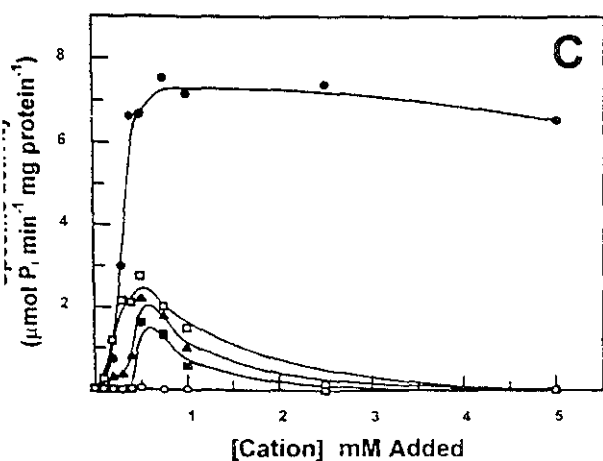
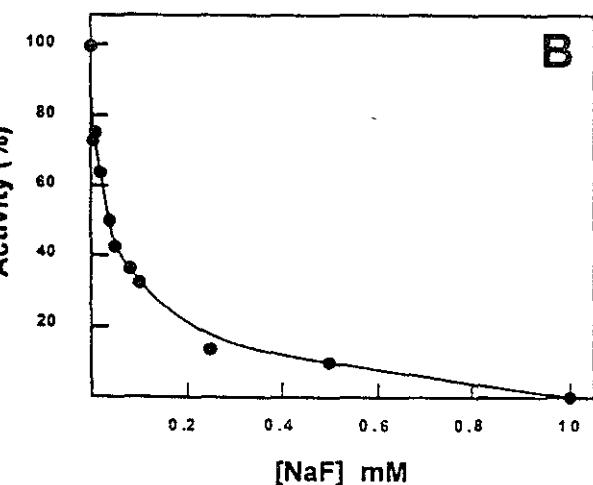
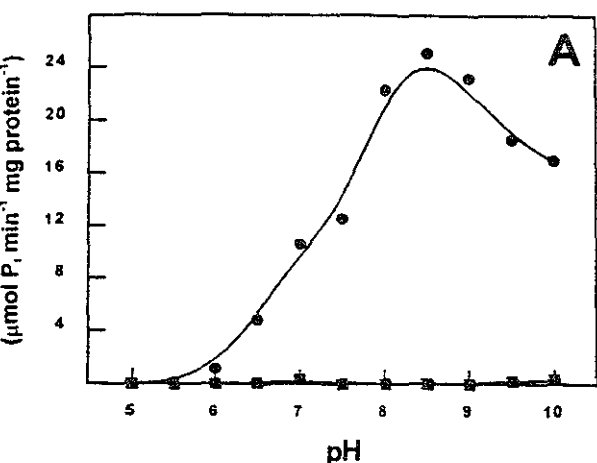


Fig. 2 A pH profile of *H. pylori* cytoplasmic PPase. Assay conditions were 50 mM Tris-maleate at the pH values indicated in the scissa, 2 mM PP<sub>i</sub>Na, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, and 4.88 μg of protein. Incubation time was 15 min at 37°C. Hydrolytic activity without (●) and with (■) 10 mM NaF. B Inhibition of *H. pylori* PPase activity by NaF. The conditions were as in A but at pH 8.5 and at the indicated NaF concentrations. C Effect of divalent cation concentration on PP<sub>i</sub> hydrolysis. Assay conditions were as follows: 50 mM Tris-maleate, pH 8.5, 0.5 mM NaPP<sub>i</sub>, and concentration of divalent cations were varied as indicated. Mg<sup>2+</sup> (●), Co<sup>2+</sup> (▲), Zn<sup>2+</sup> (■), Mn<sup>2+</sup> (□), and Ca<sup>2+</sup> (○). Incubation time was 20 min at 37°C

indicating a molecular mass of 103 kDa (data not shown). These results suggest that the native cytoplasmic enzyme of *H. pylori* is a hexamer of identical 19.1 kDa monomers, comparable to the *Escherichia coli* enzyme, which is composed of six monomers of 19.5 kDa, giving a hexamer of 118 kDa (Wong et al. 1970).

#### Substrate specificity

The purified enzyme was highly specific for the substrate Mg-PP<sub>i</sub><sup>2-</sup>. P<sub>i</sub> was not released at a significant rate from tripolyphosphate, glucose 6-phosphate, glucose 1-phosphate, β-glycerophosphate, ATP, ADP, or AMP (data not shown).

#### pH profile and effect of inhibitors

Figure 2A shows that PPase activity was optimal around a pH of 8.5. No activity was observed below pH 5.5. Other buffer systems (MES, MOPS, AMPSO and CHES, at their respective buffering capacity ranges) gave similar results. Inhibition was not observed at any pH with the phosphatase inhibitor sodium molybdate, and hydrolytic activity was not observed with *p*-nitrophenyl-phosphate as substrate (data not shown), indicating that no unspecific phosphatase is present in the preparation.

Fluoride, a known inhibitor of PPases, inhibited the cytoplasmic enzyme 100%. A plot of activity vs NaF concentration (Fig. 2B) indicates that 0.5 mM NaF gives 90% inhibition of PPase activity. The *I*<sub>50</sub> was equal to 40 μM.

#### Divalent cations requirement

All inorganic PPases, whether cytoplasmic or membrane-bound, require Mg<sup>2+</sup> to form the hydrolytic substrate and in free form to activate or regulate the enzyme (Lahti 1983). Some PPases (Josse 1966; Butler 1971; Celis and Romero 1987) are activated by other divalent cations. Figure 2C shows the cation dependence of the *H. pylori* PPase. Other cations (Mn<sup>2+</sup>>Co<sup>2+</sup>>Zn<sup>2+</sup>) substituted poorly for Mg<sup>2+</sup> in the complex with PP<sub>i</sub>, and gave limited hydrolytic activity. Ca<sup>2+</sup> did not support hydrolytic activity at any concentration. No activity was detected in the absence of added divalent cations.

The response of the cytoplasmic PPase activity to the total divalent cation concentration at a constant PP<sub>i</sub> concentration of 0.5 mM is depicted in Fig. 2C. Two kinds of divalent cation effects are evident. With MgCl<sub>2</sub>, a sigmoidal saturation curve with maximal rates when MgCl<sub>2</sub>/PP<sub>i</sub> approaches 1 is observed, suggesting that the functional substrate is Mg-PP<sub>i</sub><sup>2-</sup>. For the other tested cations, a biphasic action is evident; that is, maximal activity occurs at metal/PP<sub>i</sub> ratios near 1, and above and below this concentration the hydrolytic activity decreases. The inhibition at high cation concentrations is probably due to the presence of free cations in the assay (Celis and Romero 1987).

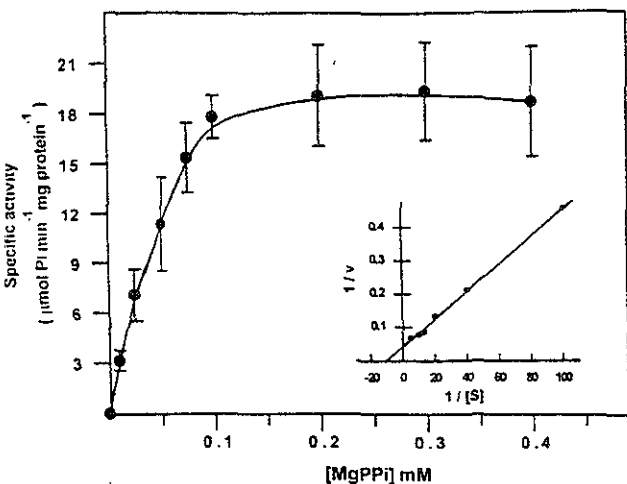


Fig. 3 Kinetics of Mg-PP<sub>i</sub> hydrolysis. Reaction conditions were 50 mM Tris maleate, pH 8.5, and Mg-PP<sub>i</sub> complex at the concentration indicated on the abscissa. Free Mg<sup>2+</sup> was added to give a fixed concentration of 1 mM. Incubation time was 3 min at 37 °C with 3 μg protein of ω-aminohexylagarose-PP<sub>i</sub> PPase fraction. Error bars represent standard deviation (n=3). Inset Lineweaver-Burk plot of these data

### Kinetic properties

The reaction rate at different Mg-PP<sub>i</sub><sup>2-</sup> concentrations follows Michaelis-Menten kinetics (Fig. 3). A Lineweaver-Burk plot (inset, Fig. 3) indicates an apparent  $K_m$  of 90 μM and a  $V_{max}$  of 24.0 μmol P<sub>i</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>. In order to obtain these kinetic parameters the more sensitive assay of Ames (1966) was used, keeping the ratio Mg<sup>2+</sup>/PP<sub>i</sub> at 1.0 and the concentration of free Mg<sup>2+</sup> at 1 mM. When the free Mg<sup>2+</sup> concentration is not fixed, sigmoidal substrate saturation curves were observed, suggesting an activation of the enzyme by free Mg<sup>2+</sup>.

### Discussion

Cytoplasmic inorganic PPases catalyze the hydrolysis of inorganic PP<sub>i</sub>, a by-product of numerous important reactions including nucleic acid polymerization, coenzyme synthesis, and amino acid and fatty acid activation. By cleaving PP<sub>i</sub>, the enzyme shifts the overall equilibrium in favor of synthesis and so plays a vital role in the cell. PPase provides the simplest model reaction for studies of energy transduction at the level of phosphoanhydride bond formation and breakdown, and the data derived will be useful for understanding the mechanism of both PP<sub>i</sub> and ATP synthesis.

We have found that, in the bacterium *H. pylori*, most PPase activity was located in the cytosol, and we present the first characterization and partial purification of this cytoplasmic PPase. The properties of the purified cytoplasmic PPase of *H. pylori* are similar to those of other soluble PPases. Cytoplasmic PPases are generally oligomeric proteins consisting of identical subunits. Eukaryotic

PPases have a homodimeric structure with subunits of approximately 30 kDa (Cohen et al. 1978; Hachimori et al. 1983). Bacterial (Wong et al. 1970), and archaeal (Verhoeven et al. 1986; Richter and Schäfer 1992; Van Alebeek et al. 1994) PPases form hexameric or tetrameric complexes with single subunits of about 20 kDa. The *H. pylori* PPase fits into the bacterial/archaeal scheme with its apparent hexameric native structure and its single subunit size of about 19 kDa.

The complete genome sequences of two *H. pylori* strains (26695 and J99) are now available (Tomb et al. 1997; Doig et al. 1999). Predicted coding sequences for the inorganic PPase (gene no. 0620 in strain 26695, and 564 in strain J99) have been found, which have a 50% identity with that of the *E. coli* PPase. The calculated molecular mass for the subunit is 19.2 kDa, close to the value obtained in this work.

The pyrophosphatase isolated from the methanogen *Methanotheroxobacterium soehngenii* is an exception to the bacterial/archaeal scheme; it has an α<sub>2</sub>β<sub>2</sub> subunit composition, with molecular masses of 33 kDa for the α subunit and 35 kDa for the β subunit (Jetten et al. 1992).

The *H. pylori* PPase molecular mass isomers that were eluted from the Sephacryl S-200 fraction could be related to the trimeric and monomeric active forms reported for *E. coli* PPase (Borschik et al. 1985, 1986). The hexameric structure of the *E. coli* enzyme can only be dissociated by severe treatments, such as incubation at high concentrations of urea, by isopropanol, or at low pH.

The optimal pH for *H. pylori* PPase was 8.5, in agreement with that for most PPases (pH 8.3–9.8) (Josse 1966; Tominaga and Mori 1977; Hachimori et al. 1975; Verhoeven et al. 1986). Only PPases from a methanogenic and two thermophilic archaea have lower optimal pH (6.5–8) (Van Alebeek et al. 1994; Jetten et al. 1992; Richter and Schäfer 1992; Meyer et al. 1995).

NaF was found to inhibit the *H. pylori* PPase. Inhibition of yeast PPase by fluoride has been extensively studied. It has been proposed that fluoride strengthens the binding of the enzyme to the Mg-PP<sub>i</sub> complex, resulting in a covalent bond (Baykov et al. 1976, 1977). However, not all PPases interact with fluoride in the same manner. Eukaryotic PPases appear to be more sensitive to fluoride (50% inhibition of yeast and porcine brain PPases occurs at 6.7 μM and 50 μM, respectively). Bacterial and archaeal enzymes are inhibited more weakly: *Rhodospirillum rubrum* (Schwarm et al. 1986) and *Methanobacterium thermoautotrophicum* PPases (Van Alebeek et al. 1994) are inhibited 50% at 5 mM and 0.9 mM fluoride, respectively. *E. coli* PPase is inhibited 91% at 1 mM (Josse 1966), and the *Thiobacillus* enzyme 81% at 1.25 mM (Tominaga and Mori 1977), whilst other bacterial PPases are not affected by fluoride at all [*Streptococcus* (Lahti and Niemi 1981), *Ureaplasma* (Davis et al. 1987), *Methanotheroxobacterium soehngenii* (Jetten et al. 1992)]. In comparison, the fluoride sensitivity of *H. pylori* ( $I_{50}$ =40 μM) is higher than that of most bacterial PPases.

The *H. pylori* PPase demonstrates the characteristic substrate and cation specificity features of PPases. The

zyme is absolutely dependent on the presence of a divalent cation for catalytic action, with  $Mg^{2+}$  conferring the highest activity.  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$  could partially replace  $Mg^{2+}$ , but the effectiveness of the latter cations is limited to a narrow range of concentration (0.3–1.0 mM). Preference for  $Mg^{2+}$  has been observed in most PPases investigated so far, with some exceptions, such as *Bacillus subtilis* PPase, which shows highest activity with  $Mn^{2+}$  (Kornberg and Kornberg 1967), and *Rhodospseudomonas elsterae* PPase, in which  $Ca^{2+}$  gives maximal hydrolytic activity (Schwarm et al. 1986).  $PP_i$ , or, more correctly, the  $g\text{-}PP_i^{2-}$  complex appears to be the sole substrate of the *H. pylori* PPase.

The role of PPase in *H. pylori* is probably very straightforward. As the enzyme is located in the cytoplasm, it plays no part in energy conservation. Its function, as for other cytoplasmic PPases, is to keep the  $PP_i$  concentration low, although the possibility that it provides some energy for other biosynthetic pathways, through the hydrolysis of  $PP_i$ , cannot be ruled out. Whether it has a role in virulence mechanisms has yet to be determined. This work increases our understanding of the metabolism of this pathogenic bacterium.

**Acknowledgements** This work was in part supported by grants N 200195, 216598 from DGAPA, and 21227051915PM9507 from CONACyT. The authors would like to thank Dr. Mark West (Microscopy and Purification of Biomolecules Unit) for his assistance with protein purification.

## References

- Ames BN (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* VIII:115–118
- Baltscheffsky M (1978) Photosynthetic phosphorylation. In: Clayton RK, Sistrom WR (eds) *The photosynthetic bacteria*. Plenum, New York, pp 595–613
- Baykov AA, Artjukov AA, Avaeva SM (1976) Fluoride inhibition of inorganic pyrophosphatase. I. Kinetics studies in a  $Mg^{2+}$ - $PP_i$  system using a new continuous enzyme method. *Biochim Biophys Acta* 429:982–992
- Baykov AA, Bakuleva NP, Nazarova TI, Avaeva SM (1977) Fluoride inhibition of inorganic pyrophosphatase. II. Isolation and characterization of a covalent intermediate between enzyme and entire substrate molecule. *Biochim Biophys Acta* 481:184–194
- Borschik IB, Pestova TV, Sklyankina VA, Avaeva SM (1985) The quaternary structure of *E. coli* inorganic pyrophosphatase is not required for catalytic activity. *FEBS Lett* 184:65–67
- Borschik IB, Pestova TV, Sklyankina VA, Avaeva SM (1986) Monomeric form of *E. coli* pyrophosphatase. Regulatory properties stability and interaction with affinity inhibitors. *Bioorg Khim* 12:902–905
- Butler LG (1971) Yeast and other inorganic pyrophosphatases. In: Boyer PD (ed) *The enzymes*, vol 4. Academic, New York, pp 529–541
- Celis H, Romero I (1987) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: effects of pH and divalent cations. *J Bioenerg Biomembr* 19:255–272
- Cohen SA, Stemer R, Keim PS, Heinrichson RL (1978) Covalent structural analysis of yeast inorganic pyrophosphatase. *J Biol Chem* 253:889–897
- Davis BJ (1964) Disc electrophoresis II. Methods and application to serum proteins. *Ann N Y Acad Sci* 121:404–427
- Davis JW, Moses IS, Ndubuka C, Ortiz R (1987) Inorganic pyrophosphatase activity in cell-free extracts of *Ureaplasma urealyticum*. *J Gen Microbiol* 133:1453–1459
- Doig P, de Jonge BL, Alm RA, Brown ED, Uria-Nickelsen M, Noonan B, Mills SD, Tummino P, Carmel G, Guild BC, Moir DT, Vovis GF, Trust TJ (1999) *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:675–707
- Hachimori A, Takeda A, Kaibuchi M, Ohkawara N, Samejima T (1975) Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biochem* 77:1177–1183
- Hachimori A, Fujii T, Ohki K, Iizuka E (1983) Purification and properties of inorganic pyrophosphatase from porcine brain. *J Biochem* 93:257–264
- Hedrick JL, Smith AJ (1968) Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch Biochem Biophys* 126:155–164
- Hornick RB (1987) Peptic ulcer disease: a bacterial infection? *N Engl J Med* 316:1598–1600
- Jetten MSM, Fluit TJ, Stams AJM, Zehnder AJB (1992) A fluoride-insensitive inorganic pyrophosphatase isolated from *Methanoxobacter soehngenii*. *Arch Microbiol* 157:284–289
- Josse J (1966) Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and catalytic properties. *J Biol Chem* 241:1938–1947
- Klemme J-H, Gest H (1971) Regulation of the cytoplasmic inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Eur J Biochem* 22:529–537
- Lahti R, Niemi T (1981) Purification and some properties of inorganic pyrophosphatase from *Streptococcus faecalis*. *J Biochem* 90:79–85
- Lahti R (1983) Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol Rev* 47:169–179
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Mansurova SE (1989) Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta* 977:237–247
- Marshall BJ, Warren JR (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. *Lancet* i:1311–1315
- Matsudaira P (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 262:10035–10038
- Megraud F (1989) *Campylobacter pylori*: enzymes. In: Rathbone BJ, Heatley RV (eds) *Campylobacter pylori* and gastro-duodenal disease. Blackwell, Oxford, pp 39–47
- Melchers K, Weitzenegger T, Buhmann A, Steinhilber W, Sachs G, Schäfer KP (1996) Cloning and membrane topology of P type ATPase from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 271:446–457
- Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, Camm AJ, Northfield TC (1994) Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *Br Heart J* 71:437–439
- Mendz GL, Hazell SL, Burns BP (1993) Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. *J Gen Microbiol* 139:3023–3028
- Meyer W, Moll R, Kath Th, Schäfer G (1995) Purification, cloning, and sequencing of archaeobacterial pyrophosphatase from the extreme thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *Arch Biochem Biophys* 319:149–156
- Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 105:361–363
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, Sibley RK (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325:1127–1131