

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS



“Sobreexpresión, Purificación y Caracterización  
Bioquímica de la Polifosfato Cinasa de *Helicobacter pylori*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

Lucía García Martínez

Directora de tesis: Dra. Irma Romero Álvarez

Codirector: Heliodoro Melis Sandoval





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Sobreexpresión, Purificación y Caracterización Bioquímica de la Polifosfato Cinasa de  
Helicobacter pylori"

realizado por la P. en B. Lucía García Martínez

con número de cuenta 9227325-6

quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Irma Romero Alvarez

Propietario CODIRECTOR

Dr. Heliodoro Celis Sandoval

Propietario

M. en C. Silvia Escobedo Martínez

Suplente

Dra. Guadalupe Isabel Oliva Ramírez

Suplente

LIBB Rodolfo García Contreras

**Consejo Departamental de Biología**

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGIA

*“ Al yo que un día soñó con esta maravillosa experiencia...”*

*“ A la Universidad Nacional Autónoma de México”*

*“ A mis padres académicos : Irma y Celis”*

*“A usted S.T.G. que me reencontró con mi destino”*

Gracias

**El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Irma Romero Álvarez, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, y bajo la co-dirección del Dr. Heliodoro Celis Sandoval en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, con el apoyo del donativo: DGAPA (PAPIIT No. IN 216598).**

## AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio 2 Edif. D del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM y al Laboratorio 222N del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

A los sinodales: **Dra. Irma Romero Álvarez, Dr. Heliodoro Celis Sandoval, M. en C. Silvia Escobedo Martínez, Dra. Guadalupe Isabel Oliva Ramírez, y LIBB Rodolfo García Contreras** por sus acertados comentarios para mejorar esta tesis.

Expreso mi profundo y más alto agradecimiento a la **Dra. Irma Romero Álvarez** por haber dirigido este trabajo. Por ser una pieza fundamental en mi formación científica y alumbrar mis pasos con gran entrega y dedicación. Porque junto a ella aprendí de la paciencia, de la constancia, del respeto y del amor que hacen a un ser humano exitoso.

Mi reconocimiento y sentida gratitud al **Dr. Heliodoro Celis Sandoval** por haber codirigido este trabajo y compartirme de su tiempo y sus conocimientos. Por ser uno de mis grandes ejemplos en el campo de la investigación científica y por haberme permitido formar parte de su familia académica y del agradable ambiente que crea a su alrededor. Por ser maestro, amigo y un gran ser humano.

A la **M. en C. Silvia Escobedo Martínez** por sus valiosas intervenciones en la parte experimental. Por estar siempre dispuesta y compartir sus conocimientos. Por ser una gran amiga y una gran mujer.

A la **Dra. Guadalupe Isabel Oliva Ramírez** por su invaluable asesoría y su importante contribución al presente trabajo, por su gran e incondicional apoyo en la parte experimental e inyectarme las energías y la buena vibra siempre que me hicieron falta.

Al **LIBB Rodolfo García Contreras** por sus valiosas opiniones y explicaciones. Por ser un gran amigo y estar siempre presente.

A la **QFB Tere Ballado** por su ayuda incondicional en el diseño de muchos de los experimentos de la parte de Biología Molecular.

Al **Q. Fco. Javier de la Mora** por auxiliarme siempre que lo solicité y facilitarme algunos de los reactivos y aparatos empleados.

Al **Biól. Luis Delaye**, Técnico Académico T.C.B. del Lab. de Microbiología de la Facultad de Ciencias, UNAM por su enorme apoyo en la construcción de la propuesta filogenética y obtención de los porcentajes de identidad entre la PPK de *H. pylori* y otros organismos bacterianos.

A **Israel Castillo**, compañero y gran amigo, por colaborar incondicionalmente en la realización de este trabajo y estar siempre e impulsarme con su buen ánimo y su cariño.

A **Hugo Beraldi**, por ser mi gran hermano y compañero de faena. Gracias por la música, la poesía y todos los buenos y no tan buenos momentos.

A **Glafira**, a **Verito**, a **Ana**, a **Areli**, a **Mariana**, a **Gisela** y a todos los que como ellas fueron la miel en los momentos amargos y supieron compartir también los momentos de celebración.

## RESUMEN

La bacteria *Helicobacter pylori* está reconocida como el principal agente etiológico de la gastritis crónica activa en humanos. Los polifosfatos son moléculas que tienen muchas funciones, entre ellas ser fuente de energía para la célula. Se ha demostrado que *H. pylori* contiene múltiples agregados de polifosfato en su citosol, el polo flagelar y asociados a la membrana, sin embargo, no se conoce hasta el momento su función en esta bacteria.

La Polifosfato cinasa o PPK es la enzima que cataliza la conversión reversible del fosfato terminal del ATP a polifosfato. La PPK está presente en bacterias pero no en eucariontes lo que plantea la posibilidad de diseñar agentes antimicrobianos específicos contra esta enzima, con mecanismos de acción que bloqueen la sobrevivencia y virulencia de las bacterias que la presenten.

Debido a la importancia médica de *H. pylori*, así como del papel de los polifosfatos como fuentes de energía, el objetivo de este trabajo fue el estudio de la PPK de este organismo.

El gen de la PPK se obtuvo mediante su amplificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El gen obtenido (de alrededor de 2027 pb) fue clonado y sobreexpresado en *Escherichia coli*. Se encontró que la expresión de la proteína es dependiente del tiempo de inducción, alcanzando su máximo a las 3h de haber añadido el inductor y presentando un bajo nivel de expresión.

La mayor parte de la enzima sobreexpresada se localiza asociada a las membranas o bien formando parte de gránulos de inclusión, sin embargo, de la fracción soluble se obtuvo una cantidad suficiente para hacer posible la purificación de la misma. En sólo tres pasos se logró purificarla cerca de 40 veces.

La PPK de *H. pylori* muestra una cinética con comportamiento Michaeliano con una  $K_m$  aparente de 1.6 mM y una  $V_{max}$  de 28 pmol de poliP  $\text{min}^{-1}\mu\text{g Prot}^{-1}$ .

Los datos obtenidos de la caracterización bioquímica muestran que la PPK parcialmente pura es altamente específica para el sustrato ATP-Mg, la síntesis de polifosfato es dependiente de la cantidad de enzima añadida; la enzima tiene un pH óptimo de 7.5 y su temperatura óptima está entre los 35 y 40 °C.

## ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucléico
ADP	difosfato de adenosina
AE	actividad específica
Amp	ampicilina
ATP	trifosfato de adenosina
Cm	cloranfenicol
EDTA	ácido etilendiamino tetra acético
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
Kan	kanamicina
LB	medio Luria Bertani
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
ppk	gen de la Polifosfato cinasa
PPK	Polifosfato cinasa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Xgal	5'bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D- galactopiranosido

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
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.	4
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> .	8
I.2.1. Morfología y taxonomía.	8
I.2.2. Cultivo de <i>H. pylori</i> .	10
I.2.3. Características generales del genoma.	10
I.2.4. Metabolismo de <i>H. pylori</i> .	11
I.2.4.1. Polifosfatos.	12
I.2.4.1.a. Polifosfatos en <i>Helicobacter pylori</i> .	14
I.2.4.1.b. Metabolismo del Polifosfato.	15
I.2.4.2 La Polifosfato Kinasa (PPK).	17
I.3. Objetivo general.	25
I.3.1. Objetivos particulares.	25
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
II.1 Materiales.	26
II.2 Métodos.	26
II.2.1 Cultivo de bacterias.	26
II.2.2 Metodología para la sobreexpresión del gen de la ppk de <i>H. pylori</i> .	26
II.2.2.1 Obtención del gen de la PPK de <i>H. pylori</i>	26
II.2.2.2 Obtención de Células Competentes y Transformación	29
II.2.2.3 Secuenciación	30
II.2.2.4 Preparación del gen para Sobreexpresarlo.	30
II.2.2.5 Sobreexpresión de la PPK.	31
II.2.2.6 Procesamiento de las alícuotas tomadas de los Cultivos.	31

II.2.2.7 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.	32
II.2.2.8 Inmunorréplica tipo Western Blott.	32
II.2.2.9 Obtención de Fracción Soluble y Fracción Membranal de las Bacterias de los Cultivos sobreexpresados para análisis por SDS-PAGE.	33
II.2.3 Purificación de la PPK en condiciones nativas.	33
II.2.4 Determinación de Actividad de PPK	34
II.2.5 Determinación de proteína.	35
II.2.6 Cálculo de las concentraciones reales del Complejo Mg-ATP y Mg <sup>2+</sup> libre en los ensayos.	35
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>36</b>
III.1 Obtención del gen de la Polifosfato cinasa (PPK) de <i>Helicobacter pylori</i> .	36
III.2 Sobreexpresión de la Polifosfato Cinasa.	37
III.2.1 Construcción del plásmido de sobreexpresión.	38
III.2.2 Sobreexpresión de la PPK en <i>E. coli</i> .	38
III.2.3 Purificación parcial de la PPK.	41
III.3 Caracterización bioquímica.	45
III.3.1 Especificidad de Sustrato.	45
III.3.2 Efecto de la Cantidad de PPK en la Síntesis de Polifosfato.	46
III.3.3 Efecto del pH sobre la Actividad de Síntesis de Polifosfatos.	47
III.3.4 Efecto de la Temperatura sobre la Síntesis de Polifosfato.	48
III.3.5 Cinética de la Síntesis de Polifosfato.	48
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>V. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>53</b>

## I. INTRODUCCIÓN

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*, mismas que han sido poco y parcialmente estudiadas. Este trabajo comprende la sobreexpresión, la purificación y la caracterización bioquímica parcial de la enzima polifosfato cinasa (PPK) de *Helicobacter pylori*, enzima encargada de la síntesis de polifosfatos.

## **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 (Moblely 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, la primera es 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 (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 caliciformes, 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 endocrinas 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.

**1.1.5. 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 (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.

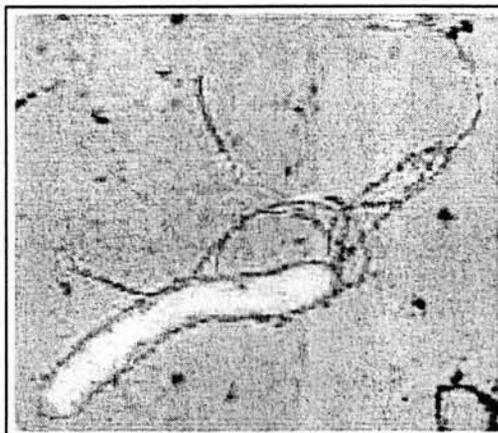
Los métodos de diagnóstico considerados no-invasivos incluyen pruebas inmunológicas y pruebas respiratorias. Las primeras consisten en el análisis por inmunoblot de las inmunoglobulinas (Ig) A e IgG, o la determinación de sus niveles en plasma y saliva; o bien, la detección de anticuerpos contra la proteína 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  $C^{13}$  o  $C^{14}$ , (Pytest y Meretek, respectivamente) y se hace la detección de  $C^{13}$  o  $C^{14}$  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).

**I.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, incluyen el 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.

## **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 µm y de 0.5 a 1.0 µm de diámetro, con una periodicidad en la espiral de 1 a 2 µm. 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 e spiral 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),

*H. pylori* presenta un tiempo de duplicación de 4-8 horas en condiciones óptimas (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 relacionadas con el metabolismo de los polifosfatos en este microorganismo.

**1.2.4.1. 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.

El polifosfato es un polímero lineal formado por decenas a cientos de residuos de fosfato unidos por enlaces fosfoanhídridos de alta energía. Constituye una fuente de nucleótidos y es posiblemente un precursor en la evolución prebiótica. Se cree que apareció sobre la Tierra antes que el ARN, el ADN y las proteínas. Se genera por la deshidratación y la condensación de P<sub>i</sub> a elevadas temperaturas. Ha sido encontrado en los condensados volcánicos, en las ventilas oceánicas hidrotermales y en todos los

organismos vivos, desde bacterias hasta mamíferos. (Kulaev, 1979; Wood, 1987; Wood y col., 1988; Kornberg, 1995; Gavigan y col., 1999; Kornberg y col., 1999). Se les han atribuido diversas funciones biológicas dependiendo de la especie, de las necesidades de la célula y de su localización subcelular.

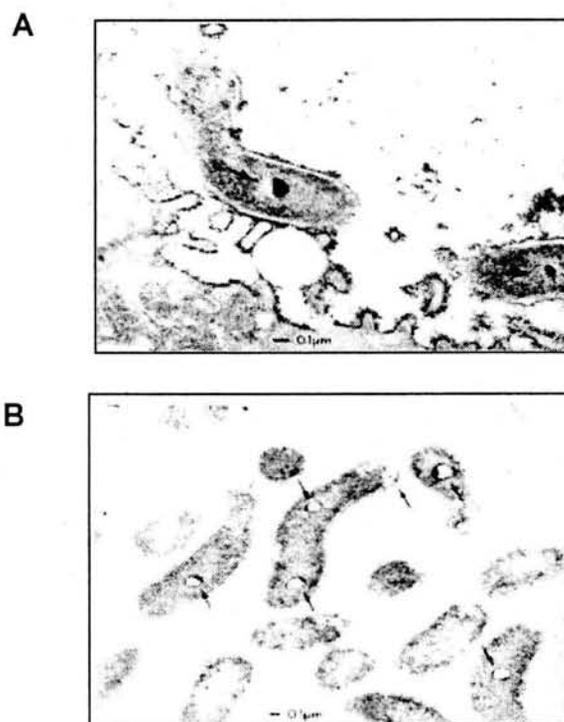
Dentro de estas funciones se encuentran las siguientes: **1)** fuente de energía en la síntesis de ATP (Kornberg, 1957; Ahn y col., 1990; Bonting y col., 1991); **2)** sustituyente del ATP en la fosforilación de la glucosa (Hsieh y col., 1993) y de algunas proteínas (Skorko, 1989); **3)** reserva de 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 polihidroxibutirato 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).

Entre las aplicaciones industriales del polifosfato se documentan las siguientes: **1)** Remediación de los ambientes contaminados por fosfato. El fosfato acumulado en aguas residuales que contienen desechos fertilizantes y descargas de agentes industriales constituye un grave peligro para los organismos de las bahías, lagos, etc., y es de hecho un problema de importancia global. Se ha encontrado que este fosfato puede ser removido mediante procesos biológicos en donde bacterias activadas aeróbicamente utilizan el Pi y lo convierten a polifosfato. Para acelerar el proceso natural se han hecho modificaciones genéticas en cepas de *Acinetobacter* y en otros organismos gram-negativos. Así también, plásmidos con el gen *ppk* han sido

introducidos en especies coliformes seleccionadas, lo cual se reporta como altamente eficaz. **2)** Acción antibacteriana. El polifosfato, como un polímero biodegradable seguro, es adicionado a productos procesados como carnes de bovinos, aves, peces; a quesos; dentríficos; y agua potable. Tiene una acción emulsificante, retiene el color, retarda la oxidación y funciona como agente antibacteriano. **3)** La enzima polifosfato cinasa (PPK) está considerada como uno de los blancos más interesantes para drogas antimicrobianas. **4)** Una forma comercial de polifosfato a bajo costo puede ser usada para regenerar ATP y otros nucleósidos trifosfatos. La enzima PPK tiene una capacidad nucleósido difosfato cinasa que ha sido utilizada para la regeneración de uridina trifosfato en la producción de oligosacáridos reemplazando fosfoenolpiruvato por polifosfato. **5)** El polifosfato puede ser usado también como sustituto de asbesto con todas sus propiedades aislantes. (Kornberg y col. 1999).

**1.2.4.1.a. Polifosfatos en *Helicobacter pylori*.** 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. 2). 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). *H. pylori* puede ser observada con dos fenotipos distintos: la forma espiral típica y la forma cocoide en la cual el crecimiento está detenido o latente. Esta última forma es observada en cultivos viejos y bajo condiciones de estrés como la privación de nutrientes, las altas temperaturas, condiciones oxidantes en su medio y estrés osmótico. Los organismos cambian su morfología durante la fase estacionaria,

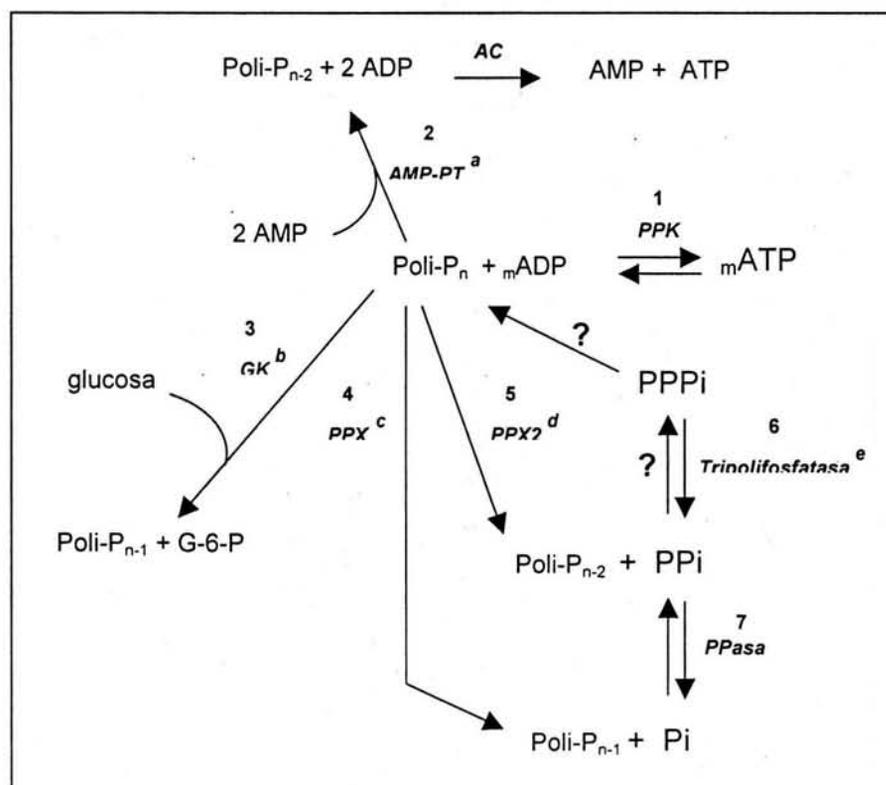
pasando, de manera mucho más evidente a la forma cocoide bajo condiciones anaeróbicas que en condiciones microaerófilicas. Los gránulos de polifosfato se acumulan predominantemente en el citoplasma de las células cocoides. Se piensa que esta forma de vida de la bacteria interviene en la transmisión de la misma y puede ser parcialmente responsable de la reinfección después de tratamientos antimicrobianos (Shirai y col. 2000). No obstante, aún queda mucho por estudiar sobre la importancia y el metabolismo de estas moléculas en *H. pylori*.



**Fig. 2. 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).

**I.2.4.1.b. Metabolismo del Polifosfato.** El estudio del metabolismo de los polifosfatos en organismos procariones y eucariotes 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 2.7.4.2) (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. 3).



**Fig. 3. 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).

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. 3).

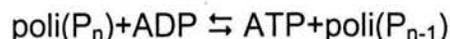
Tomando en cuenta a las enzimas involucradas en el metabolismo de los polifosfatos que se han encontrado en diferentes organismos, elaboramos un esquema que incluye a todas estas enzimas (Fig. 3), con el propósito de tener un panorama general del metabolismo de los polifosfatos y buscar las actividades 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. 3, 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.

**1.2.4.2 La Polifosfato Cinasa (PPK).** La enzima de *E. coli* es un homotetrámero de subunidades de 80 kDa, que se encuentra periféricamente asociada a la parte externa de la membrana celular, aunque la naturaleza de dicha asociación permanece incierta todavía (Seung-Jin y col. 2003; Akiyama y col. 1992). Sin embargo, las PPKs de *Propionibacterium shermanii* (Robinson y col., 1987), y *Acinetobacter* sp. (Trelstad y col., 1999) parecen ser activas como monómeros, la primera como monómero de 83

kDa y la segunda como monómero de 79 kDa. No ha sido encontrada una homología entre la secuencia de la PPK y otras proteínas.

Esta enzima cataliza la conversión reversible del fosfato terminal del ATP a polifosfato mediante la siguiente reacción (Gavigan y col. 1999) :



La PPK de *E. coli* es de las mejor estudiadas, requiere, para la síntesis de polifosfatos de  $\text{Mg}^{2+}$  como cofactor con un óptimo de 5-10 mM a 1 mM de ATP. La  $K_m$  para ATP es de 2 mM con una  $V_{m\acute{a}x}$  de 51  $\mu\text{mol} / \text{mg} / \text{min}$  (Ahn y Kornberg, 1990).

Un evento inicial en el mecanismo de reacción de la enzima es la formación de un intermediario fosforilado. Se ha encontrado que un residuo de histidina del sitio activo es fosforilado y este fosfato puede ser incorporado a la cadena de polifosfato por adición de ATP o regresar a formar ATP por adición de ADP (Kornberg y col., 1999). La enzima tiene un mecanismo en el que el polifosfato es procesado en serie en su totalidad, es decir que la cadena entera es sintetizada o utilizada sin disociación repetitiva de la enzima (Robinson y col., 1987, Kornberg y col., 1999). Más allá de esta información, no se sabe acerca del mecanismo de cómo la enzima forma progresivamente la gran cadena de polifosfato.

La síntesis de polifosfato a baja concentración de ATP presenta una fase inicial de retraso que puede ser eliminada por la adición de tetrapolifosfato. Esta fase de retardo, se piensa que, puede representar la síntesis de un "primer" o cebador que podría ser el tetrapolifosfato. A altas concentraciones de ATP no se observa fase de retardo, esto podría ser el resultado de una rápida síntesis del cebador (Ahn y Kornberg, 1990; Tinsley y col., 1993). Sin embargo, no se ha aislado ningún intermediario de la cadena de polifosfato hasta ahora (Kornberg y col., 1999).

El ADP, que es el sustrato para la reacción reversa inhibe la síntesis competitivamente con una  $K_i$  de 0.09 mM.

Otra actividad de la PPK que se ha detectado es que puede usar polifosfato como donador de fosfato en lugar de ATP y convertir GDP y otros nucleósidos difosfato a nucleósidos trifosfato, sin embargo, esta actividad es de menos del 5% de la

conversión de ADP a ATP. (Kornberg y col, 1999). La enzima puede estar involucrada también en la regulación del nivel de ribonucleósidos trifosfato y deoxirribonucleósidos que controlan la división celular y la sobrevivencia en el fase estacionaria. (Kulaev y Kulakovskaya, 2000).

Hasta el momento, aún quedan muchas características del mecanismo fino de la enzima por ser elucidadas.

Se han purificado la PPK de *E. coli* (Kornberg y Ahn, 1990) , *P. shermanii* (Robinson y col.,1987), *Neisseria meningitidis* (Tinsley y col., 1993), *Acinetobacter sp.* (Trelstad y col.,1999) *Sulfolobus acidocaldarius* (Skorko y col.,1989), *Corynebacterium xerosis* (Muhammed, 1961) y *Arthrobacter atrocyaneus* ( Levinson y col., 1975). Recientemente Zhu y colaboradores reportan haber obtenido cristales de la PPK de *E. coli* que difractan a una resolución de 2.5 Å pero el detalle de su estructura tridimensional y de dominios aun está siendo determinado. (Zhu, et col. 2003).

En extractos crudos de otros organismos se ha identificado también actividad de PPK, como en *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Kornberg y col., 1999).

La PPK está codificada por el gen *ppk* que contiene alrededor de 2064 pb en el caso de *E. coli* , las cuales resultan en una proteína de 687 aminoácidos (80,278 Da) . A 7 pb río abajo del gen de la PPK, se encuentra un marco de lectura abierto que codifica para una exopolifosfatasa (PPX), que en coordinación con la PPK, constituye un nuevo operon. (Akiyama y col.1992). El gen *ppk* ha sido clonado y secuenciado también en las siguientes especies: *Acinetobacter sp.* cepa ADP1 (Trelstad y col., 1999), *Neisseria meningitidis* (Tinsley y Gotschlich, 1995), *Klebsiella aerogenes* (Kato y col., 1993), *Pseudomonas aeruginosa* 8830 (Zago y col., 1999) y *Serratia marcescens* (Lee y col., 2003).

Utilizando todas las secuencias reportadas como PPKs de bacterias contenidas en la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) se realizó un alineamiento múltiple de sus secuencias de aminoácidos ( por Clustalx), encontrándose un porcentaje alto de identidad entre ellas; como puede verse en la

tabla 1 para la PPK de *H. pylori*. Asimismo, de éste análisis se elaboró el árbol filogenético de la figura 4 (por MEGA versión 2.1) donde se pueden observar las posibles relaciones evolutivas para los organismos empleados.

**TABLA 1. Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la Polifosfato cinasa de *Helicobacter pylori* y otros organismos bacterianos.** El porcentaje de identidad se obtuvo a partir de la matriz calculada por el programa MEGA versión 2.1 (Kumar y col. 2001).

ORGANISMO	PORCENTAJE DE IDENTIDAD %
<i>Bacillus anthracis</i>	40
<i>Staphylococcus epidermis</i>	41
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	38
<i>Lactobacillus plantarum</i>	39
<i>Wolinella succinogenes</i>	54
<i>Helicobacter hepaticus</i>	52
<i>Campylobacter jejuni</i>	49
<i>Brucella melitensis</i>	39
<i>Mesorhizobium loti</i>	41
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	39
<i>Caulobacter crescentus</i>	42
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	39
<i>Neisseria meningitidis</i>	37
<i>Nitrosomonas europaea</i>	38
<i>Chromobacterium violaceum</i>	38
<i>Bordetella pertussis</i>	36
<i>Ralstonia solanacearum</i>	37
<i>Xanthomonas campestris</i>	37
<i>Xylella fastidiosa</i>	38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
<i>Yersinia pestis</i>	34
<i>Shigella flexneri</i>	32
<i>Escherichia coli</i>	32
<i>Salmonella typhimurium</i>	32
<i>Photobacterium luminescens</i>	32
<i>Vibrio cholerae</i>	31

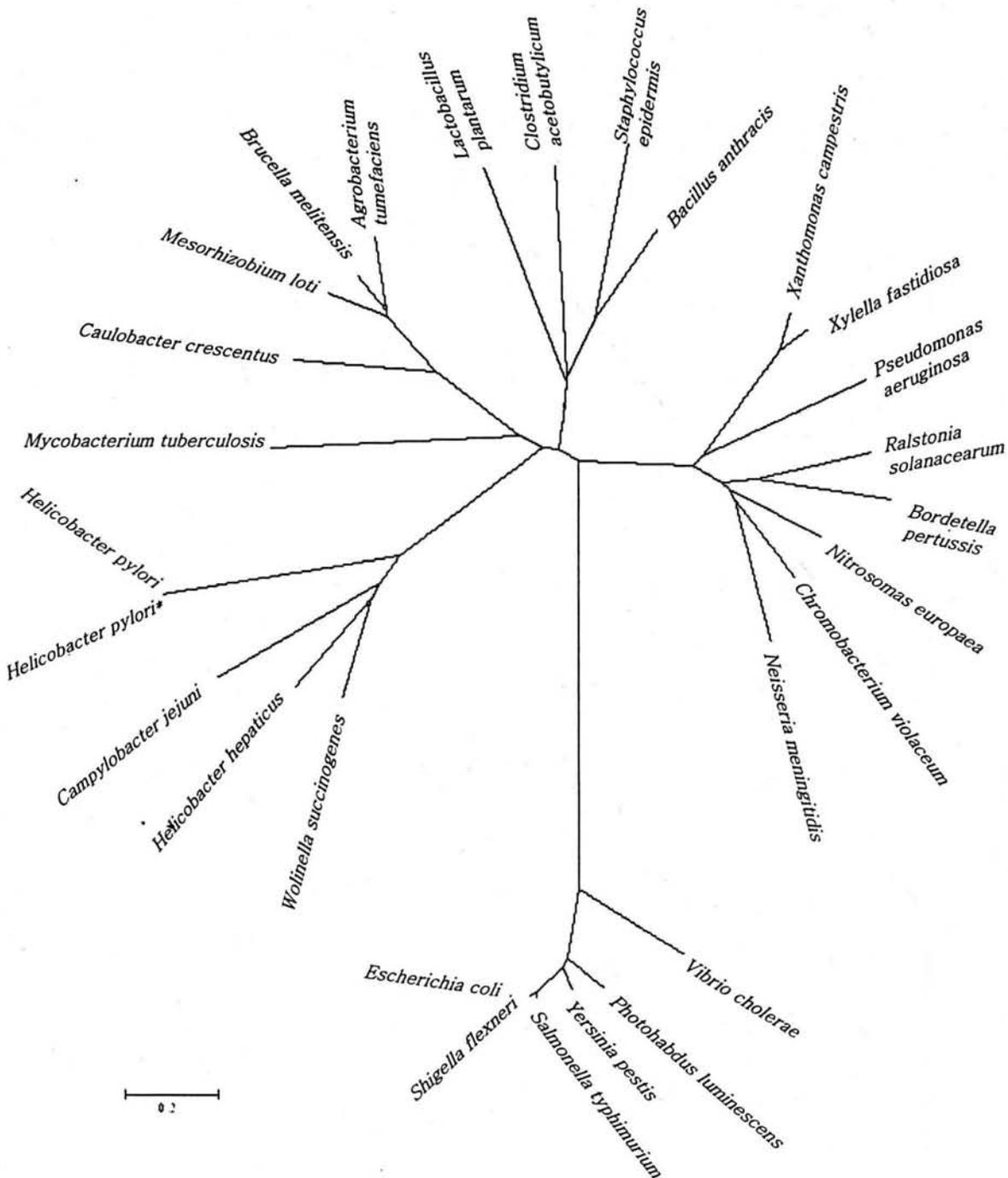


Fig. 4. Posibles relaciones filogenéticas entre las secuencias de la Polifosfato cinasa de los organismos citados en la Tabla 1. El árbol fue calculado por el programa MEGA versión 2.1 (Kumar y col. 2001).

Recientemente se descubrió en una mutante de *P. aeruginosa* carente del gen de la PPK, una actividad de síntesis de polifosfato diferente (designada PPK2). Esta nueva actividad, se diferencia de la conocida previamente (ahora llamada PPK1) por varias características: la síntesis de polifosfato es a partir de GTP o ATP, prefiere como cofactor al  $Mn^{2+}$  más que al  $Mg^{2+}$  y es estimulada diez veces por polifosfato (Tabla 2). Un carácter sobresaliente de la PPK2 es que la síntesis de polifosfato a partir de GTP tiene una menor potencia catalítica ( $V_{m\acute{a}x}$  y  $k_{cat}$ ) que la reacción reversa para formar GTP. La proporción de polifosfato utilizado/polifosfato sintetizado es 75 para la PPK2, pero sólo 0.07 para la PPK1 de *E. coli*. El correspondiente gen *ppk2* mide 1,074 pb, codifica una proteína de 357 aminoácidos y tiene una masa molecular de 40.8 kDa. Secuencias homólogas de PPK2 están presentes en otras dos proteínas en *P. aeruginosa*, en dos Archaea y en 32 bacterias más que incluyen rhizobia, cyanobacteria, *Streptomyces* y varias especies patógenas. Parece probable que la PPK1 en *P. aeruginosa* y en otros organismos que la tengan, funciona en el sentido de la síntesis de polifosfato a partir de ATP mientras que la PPK2 funciona rompiendo polifosfato para generar GTP a partir de GDP. Con base en esta idea, la aparición de esta enzima en la fase logarítmica tardía correlaciona con la necesidad del organismo de GTP para la síntesis masiva de alginato, el exopolisacárido que forma una capa mucoide alrededor del organismo. Este es un ejemplo de su utilización pero deben existir otras funciones para esta enzima ya que existen otros organismos (como *Streptomyces*) en los que esta enzima se encuentra presente y no así el recubrimiento mucoide. (Zhang y col.2002).

**TABLA 2. Características de la PPK1 y PPK2 de *P. aeruginosa* en la síntesis y utilización del polifosfato.\* (Tomada de Zhang y col. 2002).**

	PPK1*	PPK2
<b>SÍNTESIS de Polifosfato</b>		
ATP o GTP	Sólo ATP	ATP o GTP
Metales	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
Estimulación por polifosfato	No	Sí
V <sub>máx</sub> , unidades/mg	2.1X10 <sup>6</sup>	6.7X10 <sup>6</sup>
Residuos de polifosfato como producto	500-800	200-800
<b>UTILIZACIÓN de Polifosfato</b>		
ADP/GDP	34	0.9
Tamaño del polifosfato que predomina	Largo	Corto
Metales	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
V <sub>máx</sub> , unidades/mg	5.1X10 <sup>5</sup>	5.0X10 <sup>8</sup>
<b>Síntesis/utilización</b>		
<b>Tasa V<sub>máx</sub></b>	4.1	0.013

En muchas especies de bacterias como *Rhodospirillum rubrum*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Vibrio cholerae*, entre otras, se presentan tanto la PPK1 como la PPK2. Otros organismos como *H. pylori*, *E. coli*, *S. typhimurium* y otras varias especies de importancia médica, poseen únicamente PPK del tipo 1. *Corynebacterium glutamicum*, *Magnetococcus MC-1* y *Plectonema boryanum* presentan solo PPK2. Finalmente, varias especies de Archaea, entre ellas *Methanococcus jannashi* y eucariotes como *Saccharomyces cerevisiae* no presentan ninguna de las dos. (Zhang y col., 2002)

La PPK es una enzima altamente conservada en muchas bacterias entre las cuales se encuentran patógenos importantes (Fig. 4). Las cadenas de polifosfato juegan un papel relevante en las respuestas bacterianas al estrés y a la deficiencia de nutrientes, además de ser esenciales para la infección del hospedero y la virulencia de los organismos patógenos. Por ejemplo, mutantes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*, en las cuales se ha eliminado el gen de la PPK, han demostrado que la enzima es esencial para la infección y virulencia de estos patógenos (Rashid y Kornberg, 2000; Kim y col., 2002 y Rashid y col., 2000). La PPK está presente en bacterias pero no en eucariontes lo que plantea la posibilidad de diseñar agentes antimicrobianos específicos para la PPK con mecanismos de acción que bloqueen su sobrevivencia y su virulencia (Zhu y col. 2003).

### **I.3. Objetivo general.**

Estudio de la Polifosfato Cinasa de *Helicobacter pylori* .

#### **I.3.1. Objetivos particulares.**

- a) Clonar el gen de la Polifosfato Cinasa (PPK) de *Helicobacter pylori* a partir de dos clonas obtenidas de la American Type Culture Collections (ATCC).
- b) Sobreexpresar el gen de la PPK en *E. coli*
- c) Purificar la enzima PPK.
- d) Caracterización bioquímica parcial de la PPK.

## II. MATERIALES Y METODOS

### II.1 Materiales.

Todos los reactivos químicos empleados en este trabajo fueron del mas alto grado de pureza disponible comercialmente.

### II.2 Métodos.

**II.2.1 Cultivo de bacterias.** Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo fueron:

NM522	hsd $\Delta$ 5, $\Delta$ [lac-pro], F', pro <sup>+</sup> lac I <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15	Gough & Murray (1983)
GHPBS08 (627754)	pUC <sup>18</sup> (Amp <sup>r</sup> ) ppk (BamH I-Eco R I)	ATCC
GHPBY79 (627845)	pUC <sup>18</sup> (Amp <sup>r</sup> ) ppk (BamH I-Eco R I)	ATCC
BL21(DE <sub>3</sub> )	pLysS (Cm <sup>r</sup> )	

Se crecieron en medio Luria Bertani (LB) líquido o sólido, añadiéndoles las siguientes concentraciones de antibióticos dependiendo de las resistencia que presentan: 100  $\mu$ g/ml de Ampicilina (Amp) y 34  $\mu$ g/ml de Cloranfenicol (Cm).

### II.2.2 METODOLOGÍA PARA LA SOBREEXPRESION DEL GEN DE LA PPK DE *H. pylori*.

#### II.2.2.1 Obtención del gen de la PPK de *H. pylori*

Para la obtención del gen de la PPK de *H. pylori* se compraron las clonas de *E. coli*, 754 y la 845, que contenían al gen de la PPK fragmentado y para obtenerlo completo se decidió amplificarlo por PCR.

#### a) Diseño de Desoxioligonucleótidos para amplificar el gen de la PPK.

Para la síntesis de los desoxioligonucleótidos se escogieron las secuencias pertenecientes a la región amino y carboxilo de la proteína para obtener completa la secuencia del gen de la PPK de *H. pylori*.

Desoxioligonucleótido Sentido:

1342 5' TTG AAT CGT TTC TTT AAC 3'

amino terminal de la PPK

Desoxioligonucleótido Antisentido:

1343 5' TTA AAA GGT TTT AAG GGC TTG 3' carboxilo terminal de la PPK

### b) Amplificación por PCR del gen de la PPK .

Para la reacción de PCR se mezclan los siguientes reactivos:

	[Final]
ADN plasmídico de clonas 754 y 845	100-200 ng
Oligo sentido	100 picomolas
Oligo antisentido	100 picomolas
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
DNTPS	0.1 mM
Buffer Vent 10 X	1 X
Vent ADN Polimerasa	1 unidad
H <sub>2</sub> O	(aforar a 100 µl totales).

Una vez mezclados los componentes, la reacción se lleva a cabo utilizando un termociclador, sometiendo la mezcla a los siguientes ciclos:

98° C	5 min	} 2 veces
55° C	2 min	
76° C	2 min	
94° C	1 min	} 25 veces
55° C	30 seg	
72° C	1 min	
94° C	1 min	} 2 veces
55° C	1 min	
72° C	5 min	

### c) Purificación del producto de PCR.

Una vez detectada la banda esperada se realiza una electroforesis preparativa en un gel de agarosa de bajo punto de fusión 1% en amortiguador TAE a 70 V.

### **Limpieza de la Banda.**

Para purificar la banda se utilizó el método GENE CLEAN II, de la siguiente manera:

- A. Se corta la banda del gel de agarosa y se coloca en un microtubo de 1.5 ml.
- B. Se agregan 3 volúmenes de solución de NaI, se incuba la banda durante 5 min a una temperatura de entre 45°C y 55°C para disolver la agarosa.
- C. Se le añaden 5 µl de la suspensión de "glassmilk" (perlas de vidrio afines al ADN) y se incuba a 4°C de 5 a 10 min.
- D. Se centrifuga 5 seg a 14,000 rpm en una microcentrífuga para bajar el complejo ADN-"glassmilk".
- E. El producto se lava tres veces con la solución "New Wash" que contiene etanol.
- F. Se eluye el ADN con el volumen deseado de H<sub>2</sub>O precalentada a 50°C.

### **d) Clonación del producto de PCR.**

Una vez que se tiene la banda de ADN correspondiente se procede a su clonación en un vector para posteriormente secuenciarla.

El producto de PCR se clonó en el vector PCR<sup>TM</sup>II, utilizando el sistema de TA cloning (Invitrogen). Este método se basa en la propiedad de la enzima *Taq* polimerasa de poseer una actividad, templado independiente, de añadir una sola desoxiadenosina (A) a los extremos 3' de fragmentos de ADN de cadena doble, en este caso del producto de PCR; el vector linearizado de este sistema tiene en los extremos 3' una desoxitimidina (T), lo que permite que el producto de PCR se ligue con eficiencia al vector.

Dado que en la reacción de amplificación se utilizó *Vent* polimerasa en lugar de *Taq* polimerasa y debido a que la primera no deja las colas de A, es necesario añadir estos extremos a nuestros productos purificados de PCR, para lo cual se llevan a cabo los siguientes pasos:

- A. Se colocan los ng de ADN a utilizar en microtubos, se incuban en hielo y posteriormente se añaden 0.7-1 unidades de *Taq* polimerasa por tubo.

- B. Los tubos se incuban a 72° C por 10 min.
- C. La muestra se extrae inmediatamente con un volumen igual de fenol:cloroformo 1:1.
- D. Se añade 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol al 100 %.
- E. Se centrifugan las muestras a 14,000 rpm durante 5 min para precipitar el ADN.
- F. Se retira el sobrenadante, la pastilla se lava con etanol al 80 % y se deja secar al aire.
- G. La pastilla se resuspende en agua o en buffer TE, en el volumen deseado.

Una vez obtenido el producto de PCR con las colas de A se lleva a cabo la ligación:

- A. Se estima la cantidad del producto de PCR necesario para la ligación con 50 ng de vector PCR<sup>TM</sup>II, mediante la formula:

$$X \text{ ng de inserto} = \frac{(Y \text{ pb del inserto})(50 \text{ ng de vector pCR}^{\text{TM}}\text{II})}{(\text{pb del vector pCR}^{\text{TM}}\text{II}: \sim 3900)}$$

- B. Utilizando la concentración del producto de PCR previamente determinada, se calcula el volumen necesario para la ligación, la cual puede ser hecha con una relación 1:1, o bien una relación 1:3 vector/ inserto.
- C. Se incuba la reacción de ligación a 14°C por un mínimo de 4 h, de preferencia toda la noche.
- D. Se transforma la ligación en células competentes de *E. coli* NM522.

### II.2.2.2 Obtención de Células Competentes y Transformación

- A. Se crecen 5 ml de bacterias en un tubo de LB durante la noche.
- B. Se inoculan 50 ml de LB en un matraz de 250 ml con 1 ml del cultivo anterior.
- C. Se crece el cultivo a 37°C durante 2 h.
- D. Se centrifuga 10 min a 4°C en centrifuga clínica y se resuspenden las células en 6 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM estéril (manteniendo en hielo).

- E. Se incuban las células en hielo 45 min.
- F. Se centrifugan en centrifuga clínica 10 min a 4°C a 1500 rpm y se resuspenden en 1.2 ml de CaCl<sub>2</sub>.
- G. Se incuban las células en hielo 30 min.
- H. Se le adiciona la ligación a 100 µl de estas células y se dejan en hielo 30 min en tubos de microcentrífuga.
- I. Se les da un choque térmico incubándolas 45 seg a 42°C.
- J. Se les añade 1 ml de LB y se crecen las células 1 h a 37°C.
- K. Centrifugar las células 3 min en una microcentrífuga a 15,000 rpm, se decanta el sobrenadante y la pastilla se resuspende en lo que quedó de medio (aproximadamente de 50-100 µl).
- L. Se plaquean las células en cajas LB, con: los antibióticos necesarios (las resistencias del plásmido), 25 µl de Xgal (40 mg/ml) y 25 µl de IPTG 0.1 M.

### II.2.2.3 Secuenciación

Una vez determinada la presencia del inserto (que correspondía al gen completo de la PPK) en la clona llamada NM522 pCR<sup>TM</sup>II -PPK<sub>10</sub>, se llevó a cabo la secuenciación completa de este, utilizando los desoxioligonucleótidos sentido y antisentido del fago M13 y otros diseñados a partir de secuencias internas del gen de la PPK, con el objeto de verificar la secuencia del gen en ambos sentidos. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

### II.2.2.4 Preparación del gen para Sobreexpresarlo.

Para poder clonar el gen en el vector de sobreexpresión, se le añadieron al extremo amino el sitio de restricción Xho I y al extremo carboxilo el sitio Nco I, por PCR, para lo cual se diseñaron los siguientes:

Desoxioligonucleótido Sentido:

2654 5' CAT GCC ATG GCT TTG AAT CGT TTC TTT AAC 3'  
Nco I

Desoxioligonucleótido Antisentido:

2655 5' CCG CTC GAG AAA GGT TTT AAG GGC TTG 3'  
Xho I

Los medios de reacción y las condiciones de PCR fueron las mismas que ya se indicaron. El producto se purificó y se ligó en el vector de sobreexpresión pET-23d, (Amp<sup>r</sup>), se transformó en células competentes de *E. coli* NM522 para asegurar aquí la construcción del vector y secuenciar nuevamente al gen. Posteriormente se transformó en las células para sobreexpresión, *E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>) pLysS (Cm<sup>r</sup>) y se seleccionaron las clonas resistentes a Amp y Cm. Se hizo un análisis de restricción del vector de las clonas obtenidas para verificar la presencia del gen de la PPK y se escogió una, denominándose BL21 pLys-pET23d-PPK.

#### II.2.2.5 Sobreexpresión de la PPK.

1. Se inoculan tubos con 5 ml de LB Amp (50 µg/ml) Cm (34 µg/ml) con la cepa BL21 pLys-pET23d-PPK y BL21 pLys-pET23d sin el gen de la PPK como control (ambos de un cultivo en placa fresco) y se crecen a una A<sub>600</sub> de 0.6-1.0 a 37°C a 250 rpm.
2. Dos mililitros de los cultivos anteriores se inoculan en un matríz de 250 ml con 50 ml del mismo medio fresco y se crecen a una A<sub>600</sub> de 0.55-0.6 a 37°C a 250 rpm
3. Se toma una alícuota de 1 ml de cada cultivo (Muestra sin inducir) y se guarda para procesarla como se explicará más adelante. Al resto de los cultivos se les añade IPTG a una concentración final de 0.4 mM para inducir la expresión de la PPK y se incuban los cultivos a 25°C en agitación durante 6 h (se toman alícuotas de 1 ml cada hora), finalmente se cosechan las células por centrifugación del cultivo a 3,000 rpm y se guarda la pastilla a -70°C.

#### II.2.2.6 Procesamiento de las alícuotas tomadas de los Cultivos.

Una vez colectada la alícuota de los cultivos, se centrifuga a 14,000 rpm por un min y el precipitado se resuspende en 50 µl o 100 µl de Mezcla de Digestión para SDS-PAGE, se calientan a 95°C por 5 min y se vuelven a centrifugar brevemente para bajar la muestra. Así se puede guardar a -20°C hasta que se analicen en geles de

acrilamida.

### II.2.2.7 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Se llevó a cabo en presencia de SDS al 1% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 10% como describe Laemmli (1970). La concentración de acrilamida fue de 4% para el gel concentrador y de 10% para el resolovedor. Se utilizaron marcadores de color de peso molecular de Sigma en el intervalo de 6,500 a 205,000 daltones

### II.2.2.8 Inmunorréplica tipo Western Blott.

La transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa de 0.2  $\mu\text{m}$  se realizó en una cámara de Transferencia semiseca TE 70 (Hoefer) aplicando 0.8  $\text{mA}/\text{cm}^2/\text{h}$  por una hora.

1. La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó con una solución de TTBS conteniendo 5% de leche descremada durante 1 h con agitación suave a temperatura ambiente.

2. Se realizaron 3 lavados con TTBS, el primero por 15 min y dos lavados más de 10 min.

3. Se incubó con anticuerpo anti-His en una dilución 1:10,000 en TTBS a temperatura ambiente durante 1 h.

4. Se realizaron 3 lavados más como en el paso 2.

5. La membrana se revela con anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano (ECL/Amersham). La reacción de quimioluminiscencia genera un tipo de radiación a la que una placa de fotografía es sensible.

6. Se expone la membrana en una placa fotográfica Kodak.

<b>TTBS</b>	<b>para 1 l</b>	<b>TBS 10X</b>	<b>para 1 l</b>
TBS 10X	100ml	Trizma base	24.2 g
Tween 20	1ml	NaCl	292.0 g
		pH 7.5	

### II.2.2.9 Obtención de Fracción Soluble y Fracción Membranal de las Bacterias de los Cultivos sobreexpresados para análisis por SDS-PAGE.

1. Se descongela la pastilla de cultivo precipitado y se resuspende en aproximadamente 5 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 5 mM, H 8.0, se le añade 1 mM de PMSF y se sonica 3 veces por 45 seg., con descansos de 1 min en un Sonicador Branson (Sonifier 250) a máxima potencia y enfriando en un baño a 4°C. Se centrifuga el sonicado a 7,000 rpm por 20 min.

2. El precipitado y el sobrenadante se tratan de manera diferente para obtener las muestras correspondientes que se analizarán por electroforesis:

Sobrenadante: se toman 50  $\mu\text{l}$  de sobrenadante, se añaden 350  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 400  $\mu\text{l}$  de metanol al 100%, 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se agitan vigorosamente. A continuación se centrifugan por 5 min. a 14,000 rpm. Se quita el sobrenadante hasta 1 mm de la interfase proteica y se añaden 300  $\mu\text{l}$  de metanol, se agita y se centrifuga de la misma manera. El sobrenadante se descarta y el precipitado se deja secar por 5 min. para finalmente resuspenderlo en 20  $\mu\text{l}$  de Mezcla de digestión.

Precipitado: Resuspender el precipitado en 1 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 5 mM, pH 8.0, se toman 10  $\mu\text{l}$  y se añaden 20  $\mu\text{l}$  de Mezcla de digestión. Cargar en el gel 5  $\mu\text{l}$  de el precipitado o del sobrenadante así tratados.

Mezcla de Digestión (2X): Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.004 %.

### II.2.3 Purificación de la PPK en condiciones nativas.

1. Se descongela la pastilla de cultivo precipitado y se resuspende en el amortiguador A que contiene:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 5 mM, pH 8.0 (5ml/gr de pastilla), se le añade 1 mM de PMSF y se sonica 3 veces por 45 seg, con descansos de 1 min en un Sonicador Branson (Sonifier 250) a máxima potencia y enfriando en un baño a 4°C. Se centrifuga el sonicado a 7,000 rpm por 20 min.

2. Del sobrenadante obtenido se toman 5 ml y se añade 1ml de Resina Ni-NTA, se agitan suavemente por 1 h a 4°C.

3. Se carga en una columna con la salida tapada. Se destapa la salida y se colecta el

eluido ( E ).

4. Lava dos veces con 5 ml de amortiguador de lavado B:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, pH 8.0 y coleccionar los lavados (1<sup>er</sup> L y 2<sup>o</sup> L ).
5. Eluir las proteínas con 5 o 6 ml del amortiguador de elución C:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM, pH 8.0 y se coleccionan fracciones de 500  $\mu\text{l}$ .
6. Se determina actividad de PPK y se juntan las fracciones con actividad. Se dializan toda la noche a 4°C en el siguiente amortiguador:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 50 mM, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTE, 15 % glicerol , pH 7.0. Se puede concentrar la muestra o mantenerse diluida a -70°C.

#### II.2.4 Determinación de Actividad de PPK.

Se utilizó el método reportado por Tinsley et al (1993) para medir la síntesis de Polifosfatos por la PPK.

El medio de reacción contiene Glicilglicina-KOH 40 mM pH 7.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM pH 7.0,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, glicerol 15%, más el sistema regenerador de ATP: ATP 1 mM pH 8.5, Fosfoenol piruvato 6 mM y Piruvato cinasa 10 U/ml. El volumen final de la reacción es de 300  $\mu\text{l}$  . La reacción se inicia añadiendo 5  $\mu\text{g}$  de PPK obtenida de la purificación y se incuba por 30 min a 30 °C.

Precipitación de Polifosfatos con CTAB.

1. Se termina la reacción añadiendo 80  $\mu\text{l}$  de Reactivo de CTAB (Tris 0.5 M (pH 8.0), EDTA 0.25 M, CTAB (bromuro de cetil-trimetilamonio) 2.5%, NaCl 0.5M y se espera 15 min.
2. Se centrifuga a 10,000 rpm por 3 min en la microfuga.
3. La pastilla se lava con 1ml de etanol con acetato de sodio 50 mM para eliminar al detergente.
4. Se centrifuga a 10,000 rpm por 3 min y la pastilla se resuspende en 1 ml de agua bidestilada.
5. Se toman 800  $\mu\text{l}$  y se les añaden 200  $\mu\text{l}$  del Reactivo de azul de o-toluidina y se lee la disminución de la absorbencia a 650 nm (el color es estable durante 60 min). Se realiza una curva patrón con polifosfatos-65 (Poli-P-65) como estándar.

Reactivo de azul de *o*-toluidina (Damle y Krishnan, 1954): azul de *o*-toluidina 30mg/ml en ácido acético 0.2 N.

**II.2.5 Determinación de proteína.** La proteína se determinó por el método de Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina como estándar.

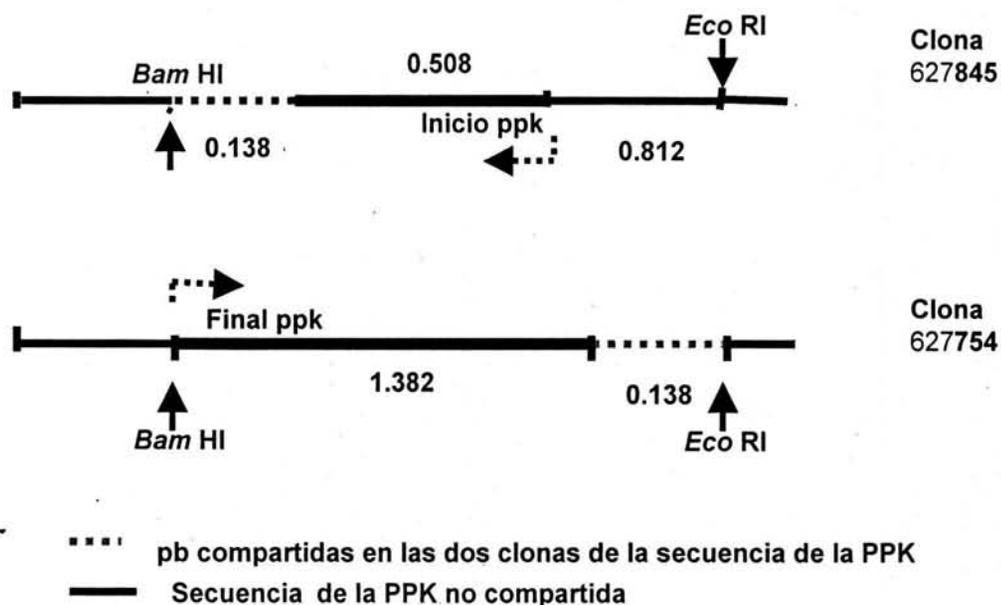
**II.2.6 Cálculo de las concentraciones reales del Complejo Mg-ATP y  $Mg^{2+}$  libre en los ensayos.** Las concentraciones libres de iones metálicos, ligandos y complejos metal-ligando se calcularon a través del programa de cómputo Iones. Las constantes de asociación utilizadas ( $K_a$ ) se tomaron de la publicación de Martell y Sillén (1971) : Pi-Mg = 2.91, PEP-Mg= 2.26, ATP-Mg= 4.04

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### III.1 Obtención del gen de la Polifosfato cinasa (PPK) de *Helicobacter pylori*.

Poco después que en 1997, se publicó el genoma completo de *Helicobacter pylori* (Tomb y col., 1997), la American Type Culture Collections (ATCC) empezó a vender comercialmente los genes de *H. pylori* clonados en *Escherichia coli*. Por esta razón se decidió comprar la clona con el gen de la PPK. Sin embargo, el gen venía como dos fragmentos en dos clonas distintas de *E. coli*: la clona 627754 y la clona 627845.

Regiones de pUC18 donde se encuentra el gen de la PPK



Para obtener el gen completo, se realizó una amplificación por PCR, utilizando los desoxioligonucleótidos 1342 y 1343 que corresponden al extremo amino y carboxilo terminales, respectivamente, de la proteína. De esta manera se obtuvo un fragmento de 2027 pb, correspondiente al tamaño del gen completo de la PPK. Este fragmento se purificó y se ligó en el vector especial para fragmentos de PCR, pCR<sup>TM</sup>II, posteriormente se transformó en *E. coli* NM522 y se

seleccionaron las clonas resistentes a Amp. Una de las transformantes se eligió para corroborar, mediante análisis de restricción y secuenciación completa, que se trataba del gen competo de la enzima. Esta clona se denominó: NM522 pCR<sup>TM</sup>II -ppk<sub>10</sub> (Fig. 5). Finalmente, se determinó por el análisis de restricción la dirección en la que estaba el gen en el vector.

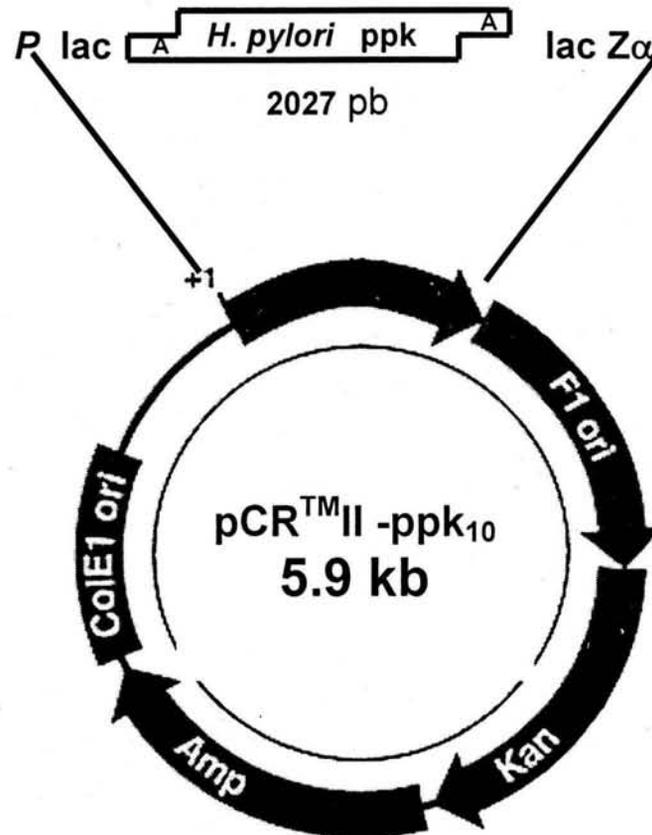


Fig. 5 Vector pCR<sup>TM</sup>II -ppk<sub>10</sub>

### III.2 Sobreexpresión de la Polifosfato Cinasa.

Existen diversos vectores comerciales para la expresión de proteínas, en este trabajo se eligió al vector pET-23d debido a que, además de haberse utilizado ampliamente con buenos resultados, resultó el más conveniente por el tipo de sitios de restricción que presenta y porque permite la producción de una proteína

de fusión con una cola de histidinas en la parte carboxílica, que se utiliza para la purificación de la proteína.

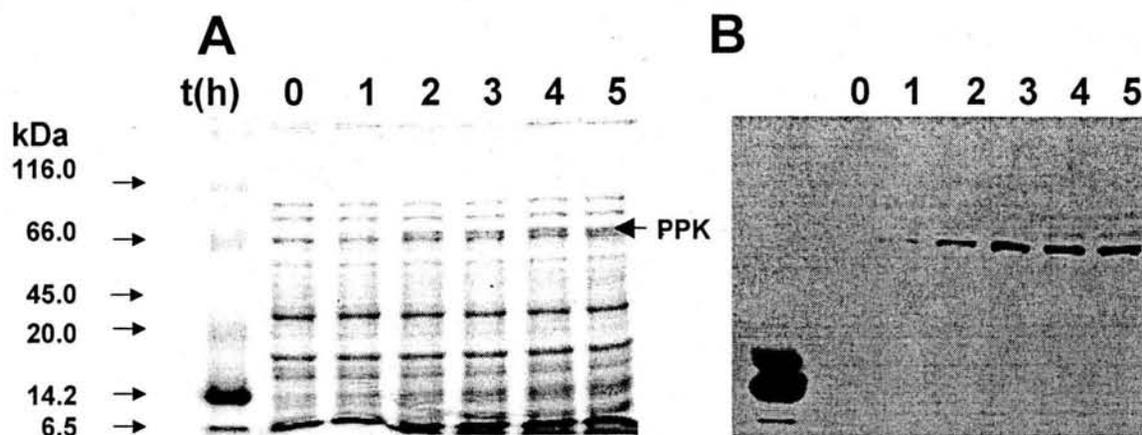
### III.2.1 Construcción del plásmido de sobreexpresión.

Para lograr la clonación del gen en una dirección precisa dentro del vector pET-23d, se diseñaron dos nuevos desoxioligonucleótidos del extremo amino y carboxilo terminal de la proteína pero añadiendo los sitios de restricción Xho I y NcoI, respectivamente (desoxioligonucleótidos No. 2654 y 2655). Utilizando estos desoxioligonucleótidos y ADN plasmídico de la clona NM522 pCR<sup>TM</sup>II-PPK<sub>10</sub> se amplificó por PCR un fragmento que contenía al gen flanqueado con los sitios de restricción ya indicados. Este fragmento se purificó y se ligó en el vector pET-23d, (Amp<sup>r</sup>), dando origen a la construcción pET-23d-PPK. A continuación se transformó en células competentes de *E. coli* NM522 para asegurar aquí la construcción del vector. Posteriormente se transformó en las células para sobreexpresión, *E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>) pLysS (Cm<sup>r</sup>) y se seleccionaron las clonas resistentes a Amp y Cm. Se hizo un análisis de restricción del vector de las clonas obtenidas para verificar la presencia del gen de la PPK y se escogió una, denominándose BL21 pLys-pET23d-PPK.

### III.2.2 Sobreexpresión de la PPK en *E. coli*.

La sobreexpresión de la PPK se llevó a cabo en primera instancia a baja escala y en las condiciones sugeridas por el proveedor del sistema utilizado (Materiales y Métodos) las cuales fueron inducción con 0.4 mM de IPTG a 37°C. Bajo esas condiciones las células expresaron una proteína que, en geles de SDS-PAGE (Fig. 6 A), migró en un peso arriba del marcador de 66 kDa y se identificó como la PPK debido a que al transferir el gel a una membrana de nitrocelulosa y realizar un inmunoblot con anticuerpos anti-His, es decir que detectan las colas de His adicionadas a la proteína, la autorradiografía correspondiente reveló a dicha banda. Esta banda no se detectó en los controles de células transformadas con el plásmido sin el gen de la PPK e inducidas de la misma manera (datos no mostrados). Así mismo, se observó que la expresión de la PPK es dependiente

del tiempo de inducción, ya que al tiempo 0 (antes de la adición de IPTG) no se observa banda en la autorradiografía y alcanza su máximo de expresión alrededor de las 3 h después de añadir el inductor, manteniéndose así hasta las 5 h en que fue tomada la última muestra de cultivo (Fig. 6 B). Hay que hacer notar que el nivel de expresión de la proteína no es muy elevado, aún en su máximo.

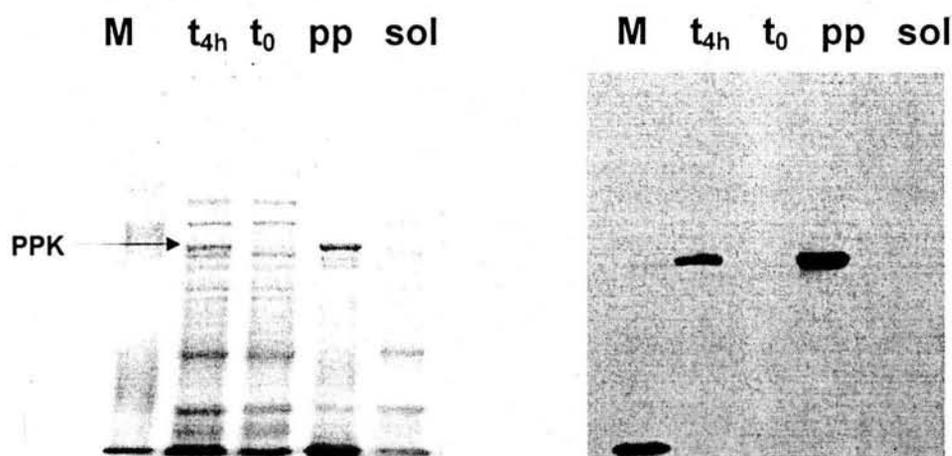


**Fig. 6. A. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de las muestras tomadas a diferentes tiempos de los cultivos sobreexpresados.** Gel al 10% teñido con azul de coomassie. Las muestras se procesaron como se indica en Materiales y Métodos. En el primer carril se presentan los marcadores de peso molecular. **B. Autorradiografía de la inmunorreplia tipo Western de un gel corrido en paralelo a A.**

El gen de la PPK predice una proteína de 80 kDa, por lo que podría pensarse que hay una discrepancia con la masa molecular observada en los geles de SDS-PAGE, sin embargo, esto ya ha sido reportado para la PPK de *E. coli* (Akiyama y col., 1992) y se ha atribuido a la naturaleza anfipática de la proteína y sucede frecuentemente en proteínas de membrana.

Para ubicar la localización de la proteína expresada, se lisaron y centrifugaron a las células del cultivo de 4 h como se indica en Materiales y Métodos, obteniéndose una fracción soluble y una de precipitado. Se corrió un gel SDS-PAGE con estas fracciones observándose claramente que la proteína expresada se localiza principalmente en el precipitado y en la fracción soluble prácticamente no se detecta (Fig. 7). Esto quiere decir que la mayor parte de la PPK se localiza asociada a las membranas o bien formando parte de gránulos de

inclusión, muchas proteínas cuando son sobreexpresadas a altos niveles, forman estos gránulos de inclusión ya que no son toleradas bien por las células.



**Fig. 7. Localización de la PPK en las células sobreexpresadas . A.** Gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul de coomassie. Las muestras se procesaron como se indica en Materiales y Métodos  $t_0$ : muestra del cultivo antes de la sobreexpresión;  $t_{4h}$ : muestra del cultivo a las 4 h de inducida la sobreexpresión; pp: fracción precipitada; sol: fracción soluble. En el primer carril se presentan los marcadores de peso molecular . **B. Autorradiografía** de la inmunorreplca tipo Western de un gel corrido en paralelo a A.

Para lograr una buena purificación en condiciones nativas, de las proteínas sobreexpresadas, es necesario que la proteína este soluble, por tal razón se trató de variar las condiciones de sobreexpresión y de lisis de las células para tratar de obtener mayores cantidades de enzima en la fracción soluble. Las condiciones variadas fueron las siguientes:

Temperatura: 25°C, 30°C y 37°C

Concentración de IPTG: 0.4 mM y 0.7 mM

Amortiguador utilizado para la Lisis:

1. Tris-HCl 50 mM, pH 8.0
2. Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1mM, Imidazol 5 mM, NaCl 300 mM
3. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8.0, Imidazol 5 mM
4. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8.0, Imidazol 5 mM, NaCl 300 mM
5. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8.0, Imidazol 5 mM, EDTA 1 mM.
6. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8.0, Imidazol 5 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM.

La elección de los componentes de estos amortiguadores se realizó con base en la asociación de la PPK con la membrana, Akiyama y col. (1992) han demostrado que la enzima puede disociarse de la membrana por tratamiento con altas concentraciones de sales o quelantes de cationes divalentes.

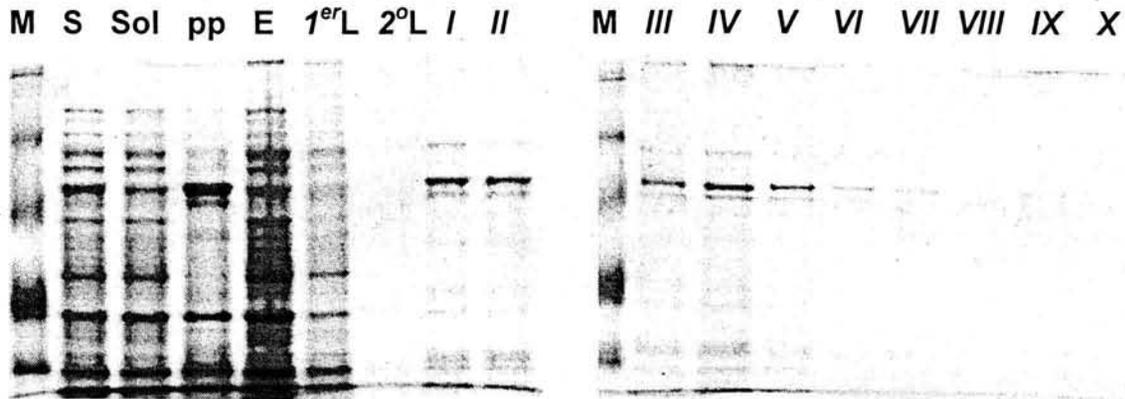
En ninguna condición de las probadas se logró incrementar la cantidad de proteína sobreexpresada, sin embargo, a 25°C, IPTG 0.4 mM y en el amortiguador No. 4, se logró detectar una señal débil pero consistente, en la autorradiografía de la fracción soluble de los cultivos sobreexpresados en dichas condiciones (datos no mostrados). A pesar de que era poca la cantidad de enzima detectada, se intentó llevar a cabo la purificación de la enzima.

### III.2.3 Purificación parcial de la PPK.

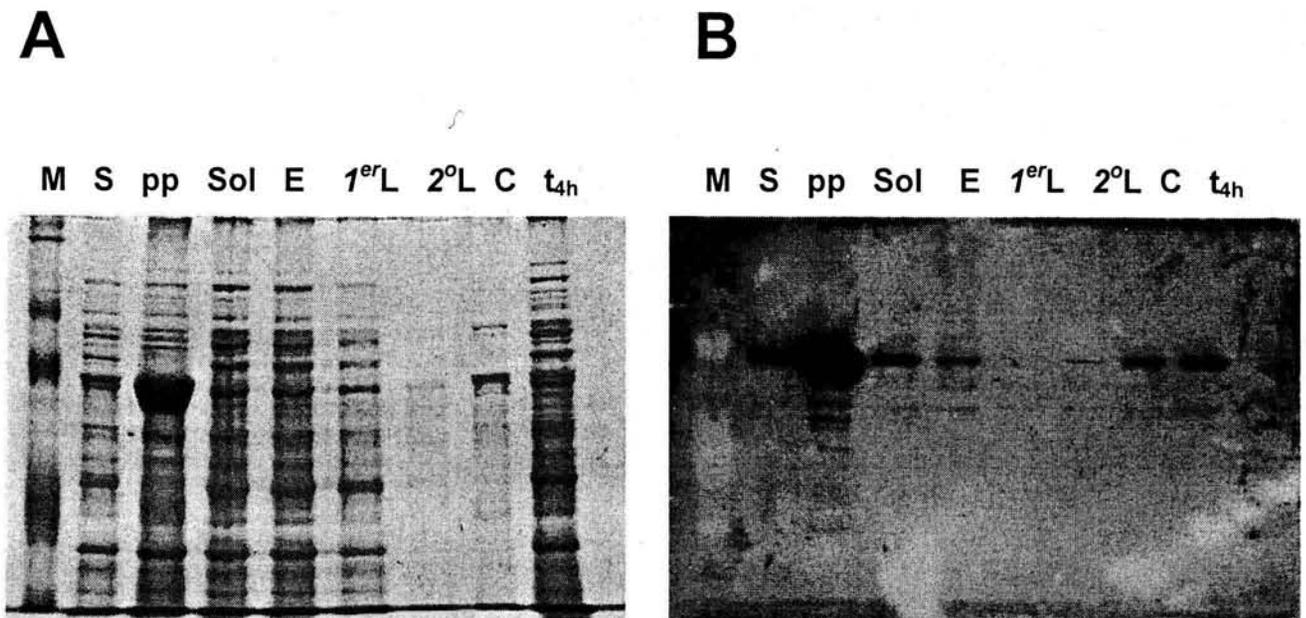
La purificación de la PPK se llevó a cabo como se indica en la sección de Materiales y Métodos a partir de la fracción soluble de los cultivos sobreexpresados de la manera que se especificó en la sección anterior.

El gel de la Fig. 8 presenta todas las etapas del proceso de purificación, observándose que desde que se aplica el amortiguador de elusión C (con 250 mM de Imidazol) la PPK empieza a salir de la columna de Ni-NTA y en la fracción VI decrece considerablemente la cantidad de enzima eluída, por tal razón se colectaron las fracciones I a V, se juntaron, concentraron y dializaron 12 h contra un amortiguador con 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTE; 15% de glicerol y fueron las que se utilizaron para la caracterización bioquímica de la enzima.

En la Fig 9, se muestra la identificación por autorradiografía del proceso de purificación de la PPK. Es claro que, aunque la mayor parte de la PPK está en la fracción precipitada, se pudo obtener de la fracción soluble una cantidad suficiente para cargar la columna de Ni-His y purificar la enzima.



**Fig. 8. Etapas de purificación de la PPK sobreexpresada .** Gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul de coomassie. Las muestras se procesaron como se indica en Materiales y Métodos. M: marcadores de peso molecular; S: cultivo sobreexpresado y sonicado; Sol: fracción soluble del cultivo sonicado; pp: fracción precipitada del cultivo sonicado; E:Eluido de la columna con amortiguador A (5 mM Imidazol); 1<sup>er</sup> L y 2<sup>o</sup> L :Primero y Segundo lavado de la columna con amortiguador B (20 mM Imidazol); I- X: Fracciones eluidas de la columna con amortiguador C (250 mM Imidazol) .



**Fig. 9. Identificación de la PPK en las diferentes etapas de purificación. A.** Gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul de coomassie. Las muestras se procesaron como se indica en Materiales y Métodos. M: marcadores de peso molecular; S: cultivo sobreexpresado y sonicado; Sol: fracción soluble del cultivo sonicado; pp: fracción precipitada del cultivo sonicado; E:Eluido de la columna con amortiguador A (5 mM Imidazol); 1<sup>er</sup> L y 2<sup>o</sup> L :Primero y Segundo lavado de la columna con amortiguador B (20 mM Imidazol); C: fracciones I-V concentradas; t<sub>4h</sub>: muestra del cultivo a las 4 h de inducida la sobreexpresión . **B. Autorradiografía** de la inmunorréplica tipo Western de un gel corrido en paralelo a A.

La purificación fue de alrededor de unas 40 veces con solo tres pasos, logrando una actividad específica de 17.1 pmoles de poliP  $\text{min}^{-1} \mu\text{g prot.}^{-1}$  (Tabla 3). La enzima purificada de esta manera es estable a  $-80^{\circ}\text{C}$  por al menos 5 meses)

**TABLA 3. Purificación de la PPK de *H. pylori*.**

Fracción	Vol total (ml)	Prot. Total (mg)	A.E.	Veces de purificación
Sonicado	30.0	146.7	0.435	1
Fracc. soluble	30.0	86.1	8.62	19.8
Cromatografía Agarosa Ni-NTA	8.8	3.0	17.1	39.3

A.E. = pmol Poli-P/min/ $\mu\text{g Prot.}$

La actividad obtenida es baja si la comparamos con las actividades obtenidas de otras PPKs. Las actividades específicas reportadas van desde las 11,000 pmoles de PoliP  $\text{min}^{-1} \mu\text{g prot.}^{-1}$  para *Acinetobacter* (Trelstad, y col., 1999) y *Neisseria meningitidis* (Tinsley y col., 1993) hasta 150 pmoles de PoliP  $\text{min}^{-1} \mu\text{g prot.}^{-1}$  para *E.coli* K-12 (Li y Brown, 1973). Debido a que no existen muchas PPKs purificadas es difícil establecer cuál es la trascendencia en esta diferencia en los valores de actividades en las diferentes bacterias. Los valores obtenidos de la actividad de *Acinetobacter*, son los de una enzima sobreexpresada y se ha reportado que la actividad específica de esta enzima varía hasta 10 veces de acuerdo a la cantidad de Pi en el medio y está en relación a la cantidad de polifosfato (Trelstad, y col., 1999). También se ha reportado que algunas PPKs purificadas requieren, para expresar el máximo de su velocidad de proteínas básicas o histonas (Li y Brown, 1973; Levinson y col. 1975).

Por otra parte, hay que tomar en cuenta que la enzima de *H. pylori* fue obtenida de la fracción soluble de las bacterias y la mayor cantidad permanece en

la fracción precipitada, por lo que puede existir la posibilidad de que la PPK que se purificó este en algún estado que no le permita tener mayor actividad, esta posibilidad no fue explorada más en este trabajo y queda para futura investigación.

### III.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.

**III.3.1 Especificidad de Sustrato.** La PPK parcialmente pura obtenida de la cromatografía de afinidad es altamente específica para el sustrato ATP-Mg. La enzima no es capaz de sintetizar polifosfato con otros sustratos tan eficientemente como el ATP, en el mejor de los casos, la síntesis de polifosfato a partir de GTP-Mg fue del 10% de la obtenida con ATP (Tabla 4). Estos resultados concuerdan con la especificidad reportada para *E. coli* (Kornberg y col., 1999), sin embargo, en el caso de *N. meningitidis*, sólo se ha visto que utiliza ATP, pero no GTP u otros trinucleótidos (Tinsley y col., 1993).

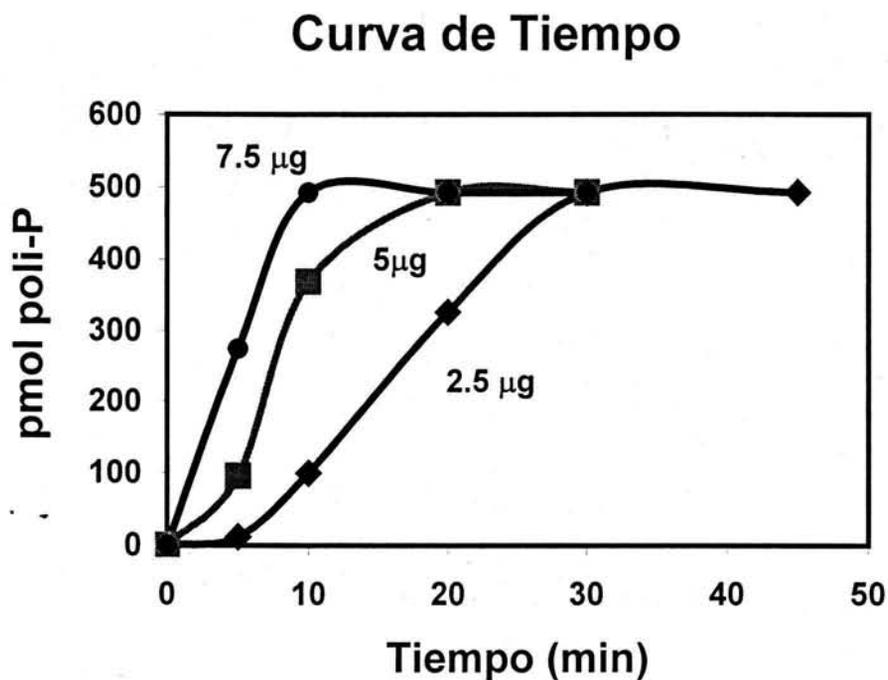
**TABLA 4. Especificidad de Sustrato**

Sustrato	Actividad Específica	%
ATP	9.70	100.0
ITP	0.11	1.1
GTP	0.96	9.9
PPi	0.56	5.8

El medio contiene Glicilglicina 40 mM pH 7.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, Glicerol 15 %, PEP 3 mM, Piruvato cinasa 10 U/ml y ATP, ITP, GTP o PPi a concentración de 1 mM. La reacción se lleva a cabo a 30°C por 30 min.

Hay que hacer la aclaración que en el ensayo se utiliza un sistema regenerador de ATP para mantener constante la concentración de ATP, ya que como sabemos el ADP, producto de la reacción de síntesis es inhibidor. La enzima encargada de hacer este sistema regenerador es la piruvato cinasa y es capaz de utilizar casi con la misma afinidad ITP o GTP, por lo que podemos estar seguros que en este ensayo se mantuvo constante la concentración de estos nucleótidos trifosfato, para el caso del PPi, no se sabe si esta enzima pueda usarlo como sustrato, por lo que no se puede concluir nada de el valor obtenido.

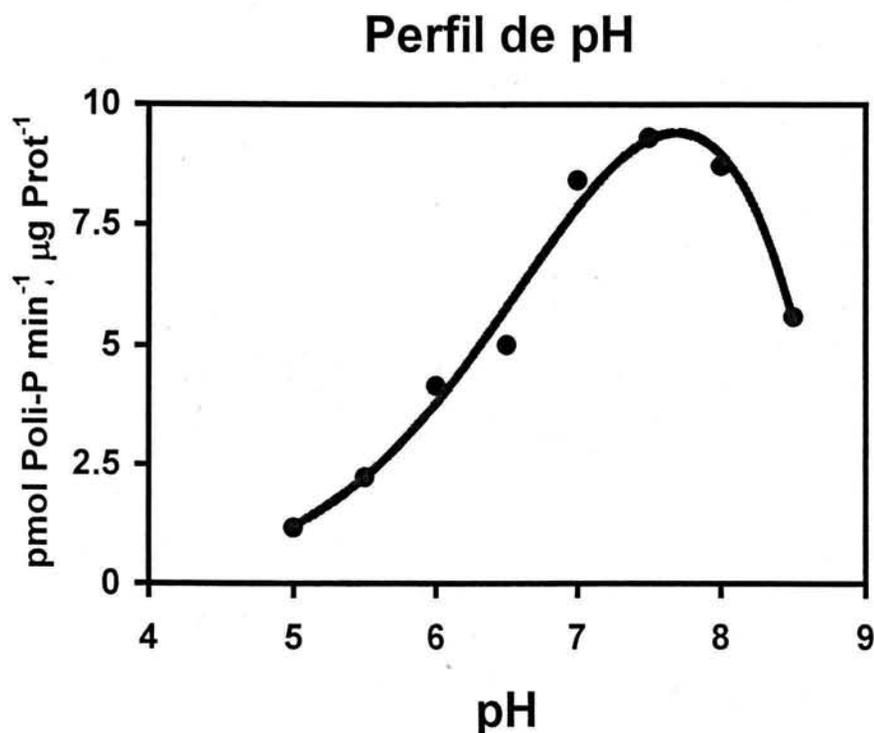
**III.3.2 Efecto de la Cantidad de PPK en la Síntesis de Polifosfato.** En la Fig. 10, se muestra como la síntesis de polifosfato depende de la cantidad de enzima añadida. Con 2.5 y 5  $\mu\text{g}$  de proteína la curva es sigmoide, pero con 7.5  $\mu\text{g}$  la curva parece perder esa forma, sin embargo, no se exploraron tiempos intermedios entre 0 y 5 min, por lo que no se puede descartar que a esta ultima concentración de enzima también la curva sea sigmoide. Esta sigmoideidad podría indicar que se requiere un tiempo de preparación para iniciar la síntesis de polifosfato, al menos en las condiciones utilizadas en estos experimentos.



**Fig. 10.** Efecto de la cantidad de proteína en el curso temporal de la Síntesis de Polifosfato por la PPK de *H. pylori*. Las condiciones del ensayo son Glicilglicina 40 mM pH 7.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, Glicerol 15 %, ATP 1.0 mM, PEP 3 mM, Piruvato cinasa 10 U/ml, variando las concentraciones de enzima como se indica.

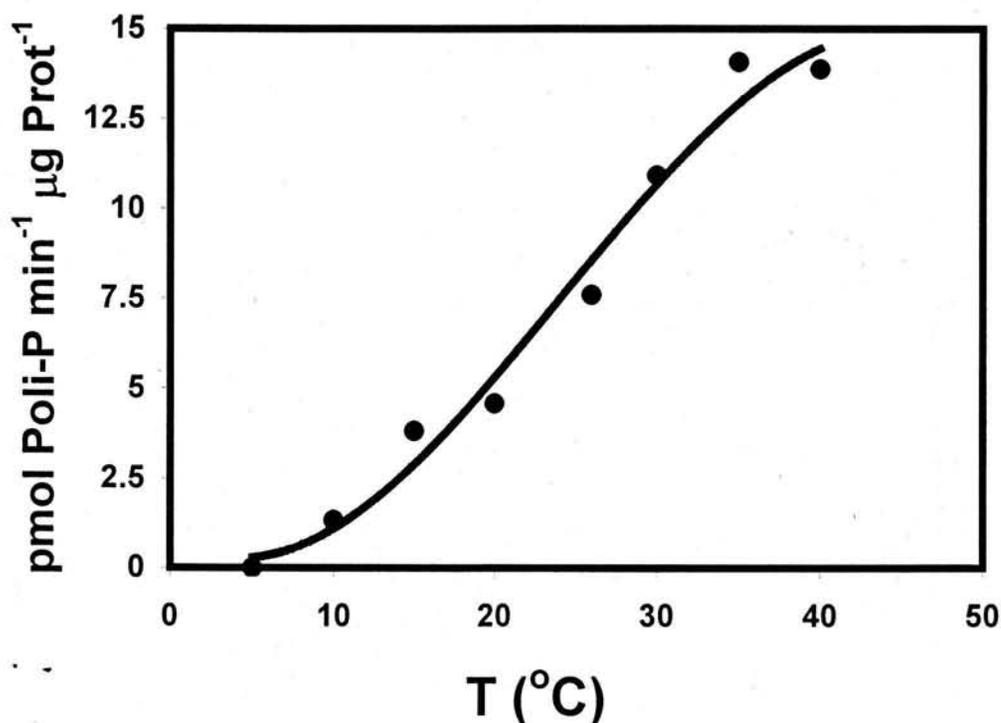
**III.3.3 Efecto del pH sobre la Actividad de Síntesis de Polifosfatos.** La Fig 11 muestra que el pH óptimo para la síntesis de polifosfatos por la PPK sobreexpresada de *H. pylori* es de 7.5. A pH de 5.0, la actividad es baja y arriba de pH 8.5 no fue posible seguir midiendo la actividad debido a que el medio de reacción se precipitaba. Utilizando otros sistemas de amortiguadores (MES, MOPS, AMPSO Y CAPS), en sus respectivos intervalos de capacidad amortiguadora, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en la Fig. 11 en que se utilizó Tris-maleato. Este óptimo es similar al de la PPK de *E. coli* ((Ahn y Kornberg, 1990) y de *C. xerosis* (Muhammed, 1961), sin embargo, el pH óptimo de la PPK de *Acinetobacter* sp. es un poco más amplio (entre 7 y 8) (Trelstad y col., 1999) y en el caso de las enzimas de *N. meningitidis* y *A. atrocyaneus* el pH óptimo es ligeramente más bajo, entre 6.0 y 7.0 (Tinsley y col.,1993).

**Fig. 11.** Curva de pH de la PPK de *H. pylori*. Las condiciones del ensayo son Tris-maleato 40 mM a los pHs indicados,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, Glicerol 15 %, ATP 1.0 mM, PEP 3 mM y Piruvato cinasa 10 U/ml . La reacción se lleva a cabo a 30°C por 30 min.



**III.3.4 Efecto de la Temperatura sobre la Síntesis de Polifosfato.** La actividad de la PPK depende de la temperatura con un óptimo entre los 35 y 40°C (Fig. 12). A temperaturas más altas de 40°C no se pudo realizar el ensayo debido a precipitación en el medio. Este óptimo es comparable con el que presenta la PPK de *Acinetobacter* sp. (Trelstad y col., 1999).

### Curva de temperatura



**Fig. 12.** Efecto de la Temperatura en la Síntesis de Polifosfato por la PPK de *H. pylori*. Las condiciones del ensayo son Glicilglicina 40 mM pH 7.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, Glicerol 15 %, ATP 1.0 mM, PEP 3 mM y Piruvato cinasa 10 U/ml a las temperaturas indicadas. La reacción se lleva a cabo a 30°C por 30 min.

**III.3.5 Cinética de la Síntesis de Polifosfato.** La velocidad de la reacción a diferentes concentraciones del sustrato ATP-Mg sigue una cinética de Michaelis-Menten (Fig 13 A). La gráfica de Lineweaver-Burk (Fig. 13 B), mostró una  $K_m$

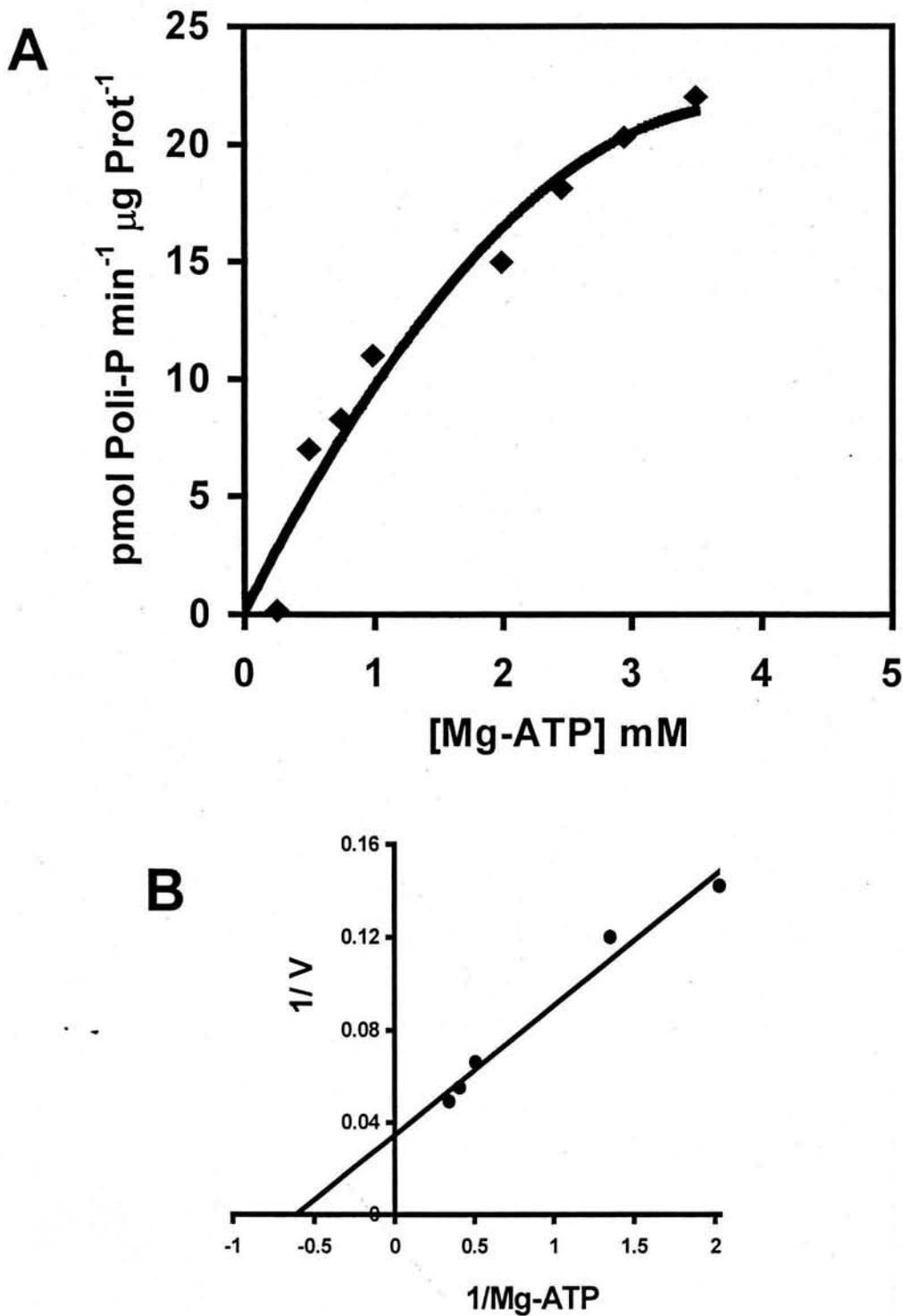
aparente de 1.6 mM y una  $V_{\max}$  de 28 pmol de poliP  $\text{min}^{-1} \mu\text{g Prot}^{-1}$ . Estos parámetros cinéticos se obtuvieron de las velocidades iniciales de reacción a pH 7.0. Se graficó la velocidad contra los valores calculados del complejo equimolecular Mg-ATP. La concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre varió en el experimento desde 6.5 mM para la concentración de Mg-ATP de 0.25 mM hasta 4.0 mM para la concentración de Mg-ATP de 3.5 mM.

La cinética del tipo michaeliano que mostró la PPK de *H. pylori* es semejante a la de la PPK de *E. coli*, sin embargo, la de las enzimas de *Acinetobacter* sp. cepa ADP1 y la de *N. meningitidis* no se ajustan al modelo de Michaelis-Menten, sino a una cinética sigmoidal. No obstante, los valores de  $K_m$  reportados (extrapolados para el caso de las enzimas de *Acinetobacter* sp. cepa ADP1 y *N. meningitidis*) son similares para las cuatro enzimas (Tabla 5).

**TABLA 5. Valores de  $K_m$  Reportadas para PPKs de Bacterias.**

Organismo	$K_m$ (mM)	Referencia
<i>H. pylori</i>	1.6	este trabajo
<i>N. meningitidis</i>	1.5	Tinsley y col.,1993
<i>Acinetobacter</i> sp	1.0	Trelstad y col.,1999
<i>E. coli</i>	2.0	Kornberg y col.,1956
<i>E. coli</i>	1.4	Li y Brown, 1973

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



**Fig. 13. A. Cinética de la PPK.** El medio contiene Glicilglicina 40 mM pH 7.0, Pi K 12.5 mM,  $MgCl_2$  10 mM, Glicerol 15 %, ATP 0.25 a 3.5 mM, PEP 3 mM y Piruvato cinasa 10 U/ml. En el eje de las abscisas se grafica la concentración calculada del complejo Mg-ATP (ver Materiales y Métodos). **B. Gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de A.**

Hay muchas preguntas que quedan por contestar acerca de la estructura, y del mecanismo de la PPK de *H. pylori* y en general de las PPKs. De las PPKs que se han estudiado, la mayor parte solamente han sido parcialmente purificadas y no se ha generado suficiente información para llegar a conclusiones concernientes a su estructura y función. Como por ejemplo, la localización de la enzima, se sabe que está adherida a la membrana por interacciones débiles, pero no se conoce con exactitud el tipo de interacciones iónicas que la hacen interactuar con la membrana. Por otra parte no ha sido esclarecida su dependencia a fosfato o polifosfato y si se requiere de una cadena corta de polifosfato como cebador o "primer", para iniciar la síntesis de las cadenas de polifosfato. Tampoco se ha estudiado a fondo su dependencia a cationes divalentes, así como las condiciones en las que puede usar otros donadores de grupos fosforilo además del ATP. Por otra parte, falta por definir su papel para mantener las concentraciones de fosfato intracelular en respuesta a los cambios extracelulares.

En cuanto a la PPK de *H. pylori*, la estructura cuaternaria funcional, no se estudió en este trabajo y queda aún por definir, se sabe que la PPK de *E. coli*, funciona como tetrámero (Ahn y Kornberg, 1990), pero las PPKs de *Acinetobacter* y *P. shermanii* funcionan aparentemente como monómeros (Trelsted y col., 1999; Robinson y col., 1987).

Acerca de la dependencia de la enzima de *H. pylori* a  $Mg^{2+}$ , es claro que la PPK requiere  $Mg^{2+}$  como cofactor del ATP, sin embargo, en este trabajo se trató de explorar esta dependencia con detalle y no se logró establecer. La PPK de *E. coli*, *N. meningitidis* y de *Acinetobacter* tienen un máximo de actividad de síntesis de polifosfato en un intervalo de concentración de  $Mg^{2+}$  que va de 5-10 mM y a concentraciones menores de 1 mM su actividad es baja o nula (Ahn y Kornberg 1990; Tinsley y col., 1993; Trelstad y col., 1999).

---

#### IV. CONCLUSIONES

- 1) El análisis de restricción y secuenciación completa confirmó que el gen obtenido mediante PCR corresponde efectivamente al gen de la Polifosfatocinasa (ppk) de *Helicobacter pylori*.
- 2) La expresión de la PPK de *H. pylori* en *Escherichia coli* es dependiente del tiempo de inducción y alcanza su máximo alrededor de las 3h después de añadir al inductor.
- 3) El nivel de expresión de la proteína no fue muy elevado, aún en su máximo.
- 4) La mayor parte de la PPK se localiza asociada a las membranas o bien formando parte de gránulos de inclusión.
- 5) Aunque la PPK se encuentra de manera importante en el precipitado, se pudo obtener de la fracción soluble una cantidad suficiente para purificar la enzima.
- 6) La purificación fue alrededor de unas 40 veces con solo tres pasos.
- 7) La actividad específica de la enzima fue de  $17.1 \text{ pmoles de poliP min}^{-1} \mu\text{g prot.}^{-1}$ , actividad baja en comparación con las actividades de otras PPKs.
- 8) La PPK parcialmente pura obtenida es altamente específica para el sustrato ATP-Mg.
- 9) La síntesis de polifosfato depende de la cantidad de enzima añadida, tiene un pH óptimo de 7.5 y su temperatura óptima está entre los 35 y 40 °C.
- 10) La PPK de *H. pylori* muestra una cinética del tipo michaeliano con una  $K_m$  aparente de 1.6 mM y una  $V_{\max}$  de  $28 \text{ pmol de poliP min}^{-1} \mu\text{g Prot}^{-1}$ .

## V. BIBLIOGRAFIA

- Adams, R.D., Braunwald, E., Isselbacher, K.J. y 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., y Kornberg, A. (1990). Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. **J Biol Chem** 265: 11734-39.
- Akiyama, M., Crooke, E. y 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. y Trust, T.J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature** 397: 176-180.
- Andreeva, N. y Okorokov, L. (1993) Purification and characterization of highly active and stable polyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* cell envelope. **Yeast** 9: 127-139.
- Archibald, F. y Fridovich, I. (1982) Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. **Arch Biochem Biophys** 215: 589-96.
- Benaïssa, M., Babin, P., Quellard, N., Pezennec, L., Cenatiempo, Y. Y Fauchère, J-L. (1996) Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversión from the bacillary to the coccoid form. **Infect Immun**. 64 (6): 2331-2335.
- Berg, H. y Tuner, 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. y Malfertheiner, P. (1993a) The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. **Epidemiol Infect**. 111:483-490.
- Bode, G., Mauch, F. Ditschuneit, H. y Malfertheiner, P. (1993b) Identification of structures containing polyphosphate in *Helicobacter pylori*. **J Gen Microbiol** 139: 3029-33.
- Bonting, C., Kortstee, G. y 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. y Normark, S. (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. **Science** 262: 1892-95.
- Buck, G. y Smith, J. (1987) Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. **J Clin Microbiol** 25: 597-99.
- Calam, J., Gibbons, A., Healey, Z., Bliss, P. y Aebi, N. (1997). How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage?. Its effects on acid gastrin physiology. **Gastroenterology**. 113 (Supp 6): S43-S49.
- Catrenich, C.E. Makin, M.K. (1991) Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* bacillary to coccoid forms. **Scand J Gastroenterol**. 26 (Supp 181): 58-64.
- Correa, P., Fox, J., Foutham, E., Ruiz, B., Lin, Y., Zavala, D., Taylor, N., Mackinley, D., de Lima, E., Portilla, H. y 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 citotoxicity and duodenal ulcer. **Proc Natl Acad Sci USA** 90: 5791-95.
- Cover, T. y Blaser, M. (1992a) *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. **Annu Rev Med**. 43: 135-145.
- Cover, T. y Blaser, M. (1992b) Purification and Characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem** 267: 10570-75.
- Cover, T., Reddy, L. y Blaser, M. (1993) Effects of ATPase inhibitors on the response of HeLa *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. **Infect Immun** 61: 1427-31.
- Chan, W.Y. Hui, P.K., Leung, K.M., Chow, J., Kwok, F. y Ng, C.S. (1994) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. **Am J Clin Pathol**. 102: 503-507.

- Chiba, N., Rao, B., Rademaker, J. y Hunt, R. (1992) Meta-analysis of the efficacy of antibiotic therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. **Am J Gastroenterol** 87: 1716-27.
- Damle, S P y Krishnan, P.S. (1954) Studies on the role of metaphosphate in molds. I. Quantitative studies on the metachromic effect of metaphosphate. **Arch. Biochem. Biophys.** 49: 58-70
- Dawnes, E. y Senior, P. (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbial Physiology.** 10: 135-266.
- 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. y Trust, T.J. (1999) *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. **Microbiol Mol Biol Rev.** 63 (3): 675-707.
- 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. y Blaser, M. (1990) Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem** 265: 9464-9469.
- Dunn, T., Gable, K. y Beeler, T. (1994) Regulation of cellular  $Ca^{2+}$  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. y Makin, K.M. (1995) Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **J Infect Dis.** 171: 459-462.
- Elitsur, Y., Hill, I., Lichtman, S.N. y 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 y 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. y Graham, D. (1988) N-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori* : a putative colonization factor antigen. **Infect Immun** 60: 2896-2906.
- 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.
- 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.
- Gavigan, J., Marshall, L. y Dobson, D.W. (1999) Regulation of polyphosphate kinase gene expression in *Acinetobacter baumannii* 252. **Microbiology.** 145: 2931-37.
- Go, M.F. y 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. y 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.
- Gough JA, Murray NE (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. **J Mol Biol** . 166: 1-19
- 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. y Price, A. 14 (Supp 1): S7-S8.
- Graham, D., Malaty, H., Evans, D., Evans, Jr., D., Klein, P. y 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. y Klein P. (1993) Clarythromycin for the eradication of *H. pylori*. **J Clin Gastroenterol** 16: 292-4.
- Guarner, J., Mohar, A., Parsonnet, J. y 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. Y 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.
- Hazell, S., Evans, D. y Graham, D. (1991) *Helicobacter pylori* catalase. **J Gen Microbiol** 137: 57-61.
- Hazell, S., Lee, A., Brady, L. y 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. y Mendz, G. (1997) How *Helicobacter pylori* works: an overview of the metabolism of *Helicobacter pylori*. **Helicobacter** 2 (1): 1-12.
- Hornick, R. (1987) Peptic ulcer disease: a bacterial infection ?. **N Engl J Med** 316: 1598-1600.
- Hsieh, P.-C., Shenoy, B., Jentoft, J. y 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.
- Johensans, C., Labigne, A. y 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., Foynes, S., Cockayne, A. y 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. Y Fox, A. (1985) An ultra-structural study of gastric *Campylobacter*-like organism "C. *pyloridis*". **J Gen Microbiol.** 131: 2335-2341.
- Kato, J., Yamamoto T., Yamada. K., y Othake, H. (1993). Cloning, sequence and characterization of the polyphosphate kinase-encoding gene (ppk) of *Klebsiella aerogenes*. **Gene** 137: 237-242.
- Keasling, J., Bertsch, L. y Kornberg, A. (1993) Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. **Proc Natl Acad Sci 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.
- Kim, M.J., Michener, R. y 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.
- Kim, K.S., Rao, N.N., Fraley, C.D. y Kornberg, A. (2002) Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp., **Proc. Natl. Acad. Sci.** 99: 7675-80.
- Kornberg, A. (1995) Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. **J Bacteriol** 177: 491-496.
- Kornberg, A., Kornberg, S.R. y Simms, E. S. (1956) Methephosphate syntesis by an enzyme from *Escherichia coli*. **Biochim Biophys Acta** 20: 215-227.
- Kornberg, SR. (1957) Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from *Escherichia coli*. **Biochem Biophys Acta** 26: 294-300.
- Kornberg, A., Rao, N.N. y Ault-Riche, D. (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. **Annu. Rev. Biochem.** 68: 89-125.
- Kulaev, IS. (1979) The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley and Sons., Inc. New York.
- Kulaev, IS., Vagabov, V. y Shabalin, Y. (1987) New data on biosynthesis of polyphosphates in yeast, pp 233-238. In Torriani-Gorini, A., Rothman, F., Silver, S., Wright, A. y Yagil, E. (Ed) **Am Soc Microbiol**, Washington, DC.
- Kulaev, I y Kulakovskaya, T (2000) Polyphosphate and phosphate pump **Ann Rev Microbiol** 54: 709-734
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. y Nei, M. (2001) **MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software**, Bioinformatics (submitted).
- Lahti, R. (1983) Microbial inorganic pyrophosphatases. **Microbiol Rev** 47: 169-79.
- Lee, A. y 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. y 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. y Hazell, S. (1993) Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. **Infect Immun** 61 : 1601-10.
- Levinson, S.L., Jacobs, L.H., Krulwich, T.A. y Li, H.C. (1975) Purification and characterization of a

- polyphosphate kinase from *Arthrobacter atrocyaneus* **J. Gen. Microbiol.** 88:65-74
- Li, H.C. y Brown G.G. (1973) Orthophosphate and histone-dependent polyphosphate kinase from *E. coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 53: 875-881.
- Logan, R., Gummert P., Schaufelberger, H. et al. (1994) Eradication of *Helicobacter pylori* with clarythromycin and omeprazole. **Gut** 35: 323-6.
- López, G. (1992) Gastritis. **Medicine** 6: 73-85.
- Loreny, B., Batel, R., Bachinski, N., Muller, W. y Schroeder, H. (1995) Purification and characterization of two exopolyphosphatases from the marine sponge *Tethya lyncunum*. **Biochim Biophys Acta.** 1245 (1): 17-28.
- Marais, A., Mendz, G.L., Hazell, S.L. y Mégraud, F. (1999) Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. **Microbiol Mol Biol Rev.** 63 (3): 642-674.
- Marshall, B. y Warren, J. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. **Lancet** i: 1311-5.
- Mauch, F., Bode, G., Ditschuneit, H. y Malfertheiner, P. (1993) Demonstration of a phospholip-rich zone in the human gastric epithelium damaged by *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology.** 105: 1698-1704.
- Mitchell, H., Li, Y., Hu, P., Liu, Q., Chen, M., Du, G., Wang, Z., Lee, A. y 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., Island, D. y Hansinger, R.P. (1995) Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol Rev** 59: 451-80.
- Morgan, D., Freedman, R., Depew, C. y Kraft, W. (1987) Growth of *Campylobacter pylori* in liquid media. **J Clin Microbiol.** 25(11): 2123-2125.
- Morris, A. y 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. y Gilat, T. (1994) Morphological transformation of *Helicobacter pylori* during prolonged incubation. Association with decreased acid resistance. **J Clin Path.** 47: 172-174.
- Moss, S. y Calam, J. (1992) *Helicobacter pylori* and peptic ulcers: the present position. **Gut.** 33:289-292.
- Muhammed, A. (1961) Studies on biosynthesis of polymetaphosphate by an enzyme from *Corynebacterium xerosis*. **Biochim Biophys Acta** 54: 121-132.
- Nomura, A., Stemmermann, G., Chyou, P., Kato, I., Pérez-Pérez, G. y Blaser, M. (1991) *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. **N Engl J Med** 325: 1132-1136.
- O'Connor, H.J. (1994) The role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **Scand J Gastroenterol.** 29: 11-15.
- Olivieri, R., Bugnoli, M., Armellini, D., Bianciardi, S., Rappuoli, R., Bayeli, P.F., Abate, L., Esposito, E., Degregorio, L., Asís, J., Basagni, C. y 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. y 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., Vogelmann, J., Orentreich, N. y 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., Vogelmann, J.H. y 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. y 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. y Blaser, M. (1988) *Campylobacter pylori* antibodies in humans. **Ann Inter Med** 109:11-17.
- Pick, U. y 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. y Slomiany, B. (1992) Inhibition of gastric mucosal laminin receptor by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Effect of eprotidine. **Biochem Int** 27: 131-38.
- Rashid, M.H. y Kornberg, A. (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97: 4885-90.
- Rashid, M.H., Rao, N.N. y Kornberg, A. (2000) Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. **J. Bacteriol.** 182: 225-27.
- Reusch, R. y 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. y Bramble, L. (1995) Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated  $Ca^{2+}$  channels in the plasma membranes of *Escherichia coli*. **Biophys J** 69: 754-66.
- Robinson, N. Clark, J. y Wood, H. (1987) Polyphosphate kinase from *Propionibacterium shermanii*. **J Biol Chem** 262: 5216-22.
- Seung-Jin L., Ok-Ryul S., Young-Choon, L. y Yong-Lark C. (2003) Molecular characterization of polyphosphate kinase (ppk) gene from *Serratia marcescens*. **Biotechnology Letters**. 25: 191-97.
- Shirai M. y col. (2000). Accumulation of polyphosphate granules in *Helicobacter pylori* cells under anaerobic conditions. **J. Med. Microbiol.** 49: 513-19
- 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.
- Skorko, R., Osipuik, J. Y Stetter, K.O. (1989) Glycogen-bound polyphosphate kinase from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. **J. Bacteriol.** 171: 5162-64
- Slomiany, B.L. y Slomiany, A. (1992) Mechanis of *Helicobacter pylori* pathogenesis: focus on mucus. **J Clin Gastroenterol.** 14 (Supp1) S114-S121.
- Sörberg, M., Nilsson, M., Hanberger, H. y Nilsson, L.E. (1996) Morphological conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid form. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 15: 216-219.
- Stackerbrandt, E., Murray. R. y 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. y 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.
- Tarkkanen, J., Kosunen, T. y 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. y Blaser,M. (1991) The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Epidemiol Rev** 13: 42-59.
- Trelstad, P., y col. (1999) Polyphosphate Kinase of *Acinetobacter* sp. Strain ADP1: Purification and Characterization of the Enzyme and Its Role during Changes in Extracellular Phosphate Levels. **Appl Env Microbiol.** 65: 3780-86 .
- Tinsley, C., Manjula, B. y Gotschlich, E. (1993) Purification and characterization of polyphosphate kinase from *Neisseria meningitidis*. **Infect Immun** 61: 3703-10.
- Tinsley, C. R. y Gotschlich, E.C. (1995) Cloning and Characterization of the Meningococcal Polyphosphate Kinase Gene: Production of Polyphosphate Synthesis Mutants. **Infec Immun** 63: 1624-30
- 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., Fitzgerald, 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.
- Tummuru, M., Cover, T. y 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 Zwet, A.A. y Mégraud, F. (1998) Diagnosis. In **C urrent o pinion in Gastroenterology**. Edited by Malfertheiner, P., Mégraud, F., Michetti, P. y Price, A. 14 (Supp 1): S27-S33.
- Voelz, H., Voelz, U. y 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. y Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet** 2: 1273-1275.
- West, A.P., Millar, M.R. y Tompkins, D.S. (1990) Survival of *Helicobacter pylori* in water and saline. **J Clin Path.** 43:609.
- Westblom, T., Madan, E. y Midkiff, B. (1991) Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*. **J Clin Microbiol** 29: 819-21.
- Woese, C.R., Kandler, O y Wheelis W:R. (1990) Bacterial Evolution. **Proc Natl Acad Sci, USA**. 87: 4576-4579.
- Wood, H. y Clark, E. (1988) Biological aspects of inorganic polyphosphates. **Annu Rev Biochem** 57: 235-260.
- Wotherspoon, A.C., Doglioni, C., Diss, T:C., Pan, L., Moschim, A., de Boni, M. y 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.
- Wurst, H. y Kornberg, A. (1994) A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 269: 10996-11001.
- Wyatt, J.I., Rathbone, B.J., Dixon, M.F. y Heatley, R.V. (1987) *Campylobacter pyloridis* and acid-induced metaplasia in the pathogenesis of duodenitis. **J Clin Pathol**. 40: 841-848.
- Zhang, H., Ishige, K. y Kornberg, A. (2002) A polyphosphate kinase (PPK 2) widely conserved in bacteria. **Proc Natl Acad Sci** . 99: 16678-83
- Zhu, Y., Lee, S. y Xu, W. ( 2003) Crystallization and characterization of polyphosphate kinase from *Escherichia coli* . **Biochem Biophys Res Comm**. 305: 997-1001