

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**“ANÁLISIS DEL COMPLEJO PROTEICO ASOCIADO A LA PROTEÍNA
HOMÓLOGA DE ACTINA (MreB) EN *Helicobacter pylori*”**

DIRECTORES

XIANWU GUO

MARIO ALBERTO RODRÍGUEZ PÉREZ

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

M. EN C. REYNA CRISTINA ZEPEDA GURROLA

REYNOSA, TAMPS

20/06/2018

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**“ANÁLISIS DEL COMPLEJO PROTEICO ASOCIADO A LA PROTEÍNA
HOMÓLOGA DE ACTINA (MreB) EN *Helicobacter pylori*”**

DIRECTORES

XIANWU GUO

MARIO ALBERTO RODRÍGUEZ PÉREZ

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

M. EN C. REYNA CRISTINA ZEPEDA GURROLA

REYNOSA, TAMPS

20/06/2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 20 del mes de Junio del año 2018, la que suscribe Reyna Cristina Zepeda Gurrola alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro B120628, adscrita al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Xianwu Guo, Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez y cede los derechos del trabajo titulado "Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones Blvd. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Reyna Cristina Zepeda Gurrola



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 12:00 horas del día 20 del mes de Junio del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:
"Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en Helicobacter pylori"

Presentada por el alumno:

Zepeda
Apellido paterno

Gurrola
Apellido materno

Reyna Cristina
Nombre(s)

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 1 | 2 | 0 | 6 | 2 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Xianwu Guo

Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez

Dr. José Alberto Narváez Zapata

Dr. Raymundo Rosas Quijano

Dr. Víctor Ricardo Moreno Medina

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez



ÍNDICE

| SECCIÓN | PÁGINA |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 20 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 21 |
| 2.1 <i>Helicobacter pylori</i> COMO PATÓGENO DEL HUMANO | 21 |
| 2.2 INFECCIÓN, TRANSMISIÓN Y PREVALENCIA DE <i>H. pylori</i> | 22 |
| 2.3 GENOMAS SECUENCIADOS DE <i>H. pylori</i>..... | 26 |
| 2.4 CITOESQUELETO EUCARIOTA | 26 |
| 2.4.1 Microtúbulos | 27 |
| 2.4.2 Filamentos de actina..... | 29 |
| 2.4.3 Filamentos intermedios | 33 |
| 2.5 CITOESQUELETO BACTERIANO..... | 35 |
| 2.6 PROTEÍNA MreB..... | 36 |
| 2.7 MreB EN <i>Helicobacter pylori</i> | 39 |
| 2.8 INTERACTOMA DE MreB EN <i>E. coli</i> | 39 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 53 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 54 |
| 5. OBJETIVOS | 55 |
| 5.1 OBJETIVO GENERAL | 55 |
| 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 55 |
| 6. METODOLOGÍA | 56 |
| 6.1 ESTABLECIMIENTO DE TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO PROTEICO DE INTERACCIÓN CON MreB..... | 56 |
| 6.1.1 Transformación natural de <i>H. pylori</i> 26695..... | 57 |
| 6.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE INTERACCIÓN CON MreB MEDIANTE ENSAYO “PULL-DOWN” | 59 |
| 6.2.1 Construcciones Genéticas | 59 |

| | |
|---|-----------|
| Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en <i>Helicobacter pylori</i> | |
| 6.2.2 Clonación de <i>mreB</i> en <i>pET19b</i> | 61 |
| 6.2.3 Adición de la etiqueta GST a <i>pET19b-mreB</i> | 67 |
| 6.2.4 Clonación de <i>gst</i> en <i>pET19b</i> | 69 |
| 6.2.5 Sobre-expresión de MreB y GST recombinantes..... | 70 |
| 6.2.6 Purificación de MreB y GST recombinantes | 72 |
| 6.2.7 Análisis del plegamiento y estructuración de la fracción soluble e insoluble de las proteínas recombinantes | 73 |
| 6.2.8 Ensayo “pull-down” e identificación de las proteínas de interacción con MreB de <i>H. pylori 26695</i> mediante espectrometría de masas..... | 74 |
| 6.3 CONFIRMACIÓN DE LAS INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO CON MreB MEDIANTE MÉTODOS EXPERIMENTALES | 76 |
| 6.4 CONFIRMACIÓN DE LAS INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO CON MreB MEDIANTE BIOINFORMÁTICA..... | 80 |
| 6.4.1 Elaboración del interactoma de MreB en <i>H. pylori 26695</i> | 80 |
| 6.4.2 Modelamiento por homología de MreB recombinante y predicción de motivos funcionales para su interacción con factores de virulencia en <i>H. pylori 26695</i> | 80 |
| 7. RESULTADOS..... | 81 |
| 7.1 TRANSFORMACIÓN DE <i>H. pylori 26695</i> CON <i>pJET-CF</i>..... | 81 |
| 7.1.1 Confirmación de <i>pJET-CF</i> mediante secuenciación y restricción..... | 81 |
| 7.1.2 Confirmación de <i>pJET-CF</i> mediante secuenciación | 81 |
| 7.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO ASOCIADO A MreB DE <i>H. pylori 26695</i> Y CONFIRMACIÓN <i>IN VITRO</i> MEDIANTE EL SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO BACTERIANO..... | 84 |
| 7.2.1 Confirmación de las construcciones generadas para el “pull-down” | 84 |
| 7.2.2 Transformación natural de <i>H. pylori 26695</i> | 85 |
| 7.2.3 Cuantificación y determinación del plegamiento y estructuración de las proteínas recombinantes MreB y GST..... | 102 |
| 7.2.4 Identificación de las proteínas del complejo de interacción con MreB recombinante. | 106 |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | |
|--|------------|
| 7.2.5 Confirmación de las interacciones de las proteínas del complejo asociado con MreB..... | 112 |
| 7.3 PREDICCIÓN DE INTERACCIONES ENTRE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE ASOCIACIÓN A MreB DE <i>H. pylori</i> 26695..... | 117 |
| 7.4 PREDICCIÓN DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA ENTRE MreB Y FACTORES DE VIRULENCIA DEL COMPLEJO EN <i>H. pylori</i> 26695..... | 118 |
| 7.4.1 Modelamiento por homología de MreB de <i>H. pylori</i> 26695..... | 118 |
| 7.4.2 Generación de interfaces de interacción entre MreB y factores de virulencia en <i>H. pylori</i> 26695. | 119 |
| 8. DISCUSIÓN | 122 |
| 8.1 LETALIDAD DE LA CONSTRUCCIÓN <i>pJET-CF</i> EN <i>H. pylori</i> 26695..... | 122 |
| 8.2 DETERMINACIÓN DEL COMPLEJO PROTEICO DE INTERACCIÓN CON MreB EN <i>H. pylori</i> 26695 | 122 |
| 8.2.1 Preferencia de uso de codones de MreB recombinante | 122 |
| 8.2.2 Plegamiento y estructuración de las proteínas recombinantes..... | 123 |
| 8.2.3 Complejo proteico de interacción con MreB de <i>H. pylori</i> 26695..... | 125 |
| 8.2.4 Interacción <i>in silico</i> de MreB de con factores de virulencia en <i>H. pylori</i> 26695. | 130 |
| 9. CONCLUSIONES | 131 |
| 10. RECOMENDACIONES..... | 132 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA..... | 133 |
| 12. ANEXOS | 147 |
| ABSTRACT | 19 |
| AGRADECIMIENTOS | 16 |
| DEDICATORIA | 17 |
| LISTA DE CUADROS..... | 9 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 10 |
| LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURA | 13 |
| RESUMEN..... | 18 |

LISTA DE CUADROS

| Cuadro | Página |
|--|--------|
| 1 Interacciones de MreB en <i>Helicobacter pylori</i> 26695 predichas en String 10.5..... | 42 |
| 2 Reacción general de digestión empleando una enzima de restricción | 57 |
| 3 Reacción general de PCR para la obtención de amplicones | 61 |
| 4 Condiciones generales de amplificación en la obtención de productos de PCR | 62 |
| 5 Reacción de digestión empleando dos enzimas de restricción | 64 |
| 6 Reacción general de ligación empleada en la generación de construcciones genéticas | 65 |
| 7 Comparación de la predicción de los porcentajes de los componentes de la estructura secundaria de MreB y GST recombinantes, arrojados por Phyre 2 y Dichroweb | 105 |
| 8 Proteínas del complejo de interacción con MreB recombinante en <i>Helicobacter pylori</i> 26695 | 107 |
| 9 Valores comparativos de la actividad de β -galactosidasa determinada en las proteínas de interacción positiva con MreB | 115 |
| 10 Iniciadores diseñados en este estudio | 148 |
| 11 Variaciones en las condiciones de amplificación de los 27 genes codificantes para las proteínas del complejo de interacción con MreB, en función de su longitud | 151 |
| 12 Condiciones de cultivo y uso de las cepas empleadas | 152 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|--------|
| 1 Epidemiología de la infección causada por <i>Helicobacter pylori</i> a nivel mundial..... | 22 |
| 2 Colonización de la cavidad gástrica del humano por <i>H. pylori</i> | 24 |
| 3 Conformación y dinámica de los microtúbulos. | 27 |
| 4 Proteínas motoras..... | 28 |
| 5 Ensamblaje de los filamentos de actina..... | 29 |
| 6 Mantenimiento y reorganización de la forma celular por los filamentos de actina..... | 30 |
| 7 Funciones de los filamentos de actina en el las células intestinales..... | 31 |
| 8 Formación de un filamento intermedio..... | 33 |
| 9 Dinámica de los filamentos de MreB en <i>Caulobacter crescentus</i> | 36 |
| 10 Interactoma de Mreb en <i>Escherichia coli</i> | 39 |
| 11 Predicción de las interacciones de MreB con otras proteínas en <i>H. pylori</i> 26695..... | 40 |
| 12 Purificación en tándem de proteínas | 44 |
| 13 Técnica de co-inmunoprecipitación..... | 45 |
| 14 Sistema de doble híbrido en levadura | 47 |
| 15 Purificación de una proteína recombinante etiquetada con polihistidinas mediante IMAC..... | 49 |
| 16 Unión de la histidina al níquel durante la IMAC..... | 50 |
| 17 Técnica del ensayo “pull-down”..... | 51 |
| 18 Construcción <i>pJET-CF</i> efectuada mediante “PCR sewing”..... | 55 |
| 19 Construcciones genéticas efectuadas para el establecimiento del ensayo “pull-down” en <i>Helicobacter pylori</i> 26695..... | 59 |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | | |
|----|---|----|
| 20 | Confirmación de las interacciones del complejo proteico con MreB recombinante usando el sistema de doble híbrido en bacteria..... | 77 |
| 21 | Secuencia nucleotídica de <i>pJET-CF</i> | 81 |
| 22 | Confirmación de <i>pJET-CF</i> por restricción..... | 82 |
| 23 | Tinción Gram durante la transformación natural de <i>H. pylori</i> 26695..... | 83 |
| 24 | Amplificación del gen <i>mreB</i> | 87 |
| 25 | PCR en colonia de las colonias transformantes para <i>pSCAmreB</i> | 85 |
| 26 | PCR en colonia para la identificación de células <i>E. coli</i> <i>DH5α</i> transformantes con <i>pTEmreB</i> | 86 |
| 27 | Confirmación de <i>pSCAmreB</i> por restricción con <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> | 87 |
| 28 | Confirmación de <i>pETmreB</i> por restricción con <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> | 87 |
| 29 | Alineamiento de la secuencia nucleotídica de <i>mreB</i> con la reportada en el NCBI..... | 89 |
| 30 | Alineamiento de la secuencia aminoacídica de MreB con la reportada en el NCBI..... | 90 |
| 31 | Producto de amplificación <i>gst</i> a partir de <i>pAcghLT-B</i> | 91 |
| 32 | PCR en colonia para la identificación de células <i>E. coli</i> <i>DH5α</i> transformantes con <i>pSCAgst</i> y con <i>pETgst</i> | 92 |
| 33 | Confirmación de <i>pSCAgst</i> por restricción con <i>NdeI</i> | 93 |
| 34 | Confirmación de <i>pETgst</i> por restricción con <i>NdeI</i> | 94 |
| 35 | Alineamiento de la secuencia de <i>gst</i> obtenida con la de <i>gst</i> del vector <i>pAcghLT-B</i> | 95 |
| 36 | PCR en colonia para la identificación de células <i>E. coli</i> <i>DH5α</i> transformantes con <i>pETmreBr</i> | 96 |
| 37 | Confirmación de la orientación de <i>gst</i> en <i>pETmreBr</i> mediante PCR..... | 97 |
| 38 | Uso diferente de codones en MreB de <i>H. pylori</i> 26695..... | 98 |
| 39 | Sobre-expresión de MreB recombinante en <i>E. coli</i> <i>Codon Plus</i> | 99 |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | | |
|----|--|-----|
| 40 | Identificación de la fracción soluble e insoluble de las proteínas recombinantes MreB y GST..... | 100 |
| 41 | Purificación de las proteínas MreB y GST recombinantes..... | 100 |
| 42 | Espectros de fluorescencia de las proteínas recombinantes MreB y GST..... | 102 |
| 43 | Espectros de dicroísmo circular de las proteínas recombinantes MreB y GST.... | 103 |
| 44 | Elipticidad media de residuos en MreB recombinante..... | 104 |
| 45 | Resultado del ensayo “pull-down” empleando MreB y GST recombinantes..... | 106 |
| 46 | Amplificación de los productos de PCR de los 27 genes usados en las construcciones del doble híbrido en bacteria..... | 112 |
| 47 | PCR en colonia para confirmar las construcciones generadas con los 27 genes, usadas en el doble híbrido en bacteria..... | 113 |
| 48 | Confirmación de las interacciones de proteínas con MreB empleando el doble híbrido en bacteria..... | 114 |
| 49 | Interactoma de MreB de <i>H. pylori</i> 26695 generado en Cytoscape..... | 116 |
| 50 | Modelo tridimensional de MreB de <i>H. pylori</i> 26695 generado en Geno 3D..... | 117 |
| 51 | Interfaces de interacción de MreB generadas en Prism 2.0..... | 119 |
| 52 | Residuos de las interfaces de interacción de MreB de <i>H. pylori</i> 26695..... | 120 |
| 53 | Esquema comparativo entre el complejo proteico de interacción con MreB en <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>H. pylori</i> | 126 |
| 54 | Mapa de restricción del vector de expresión <i>pET19b</i> | 146 |
| 55 | Clonación de <i>mreB</i> en pSCA de StrataClone®..... | 147 |
| 56 | Vector <i>pLacIRARE</i> de <i>E. coli</i> Rosetta <i>gami</i> | 153 |

LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURA

| | |
|-----------------|-------------------------------------|
| % | porcentaje |
| ° C | grado centígrado |
| μL | microlitros |
| μm | micrómetros |
| A22 | S-(3,4-dicloro benzil) isotiourea |
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| ADP | adenosín difosfato |
| ARN | ácido ribonucleico |
| ARNt | ácido ribonucleico de transferencia |
| ATP | adenosín trifosfato |
| AU | unidades arbitrarias |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| dNTP | dinucleótido |
| D O | densidad óptica |
| DTT | ditiotreitól |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| g | gramos |
| GDP | guanosín difosfato |
| GST | glutación S-transferasa |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | |
|----------------------------------|---|
| GTP | guanosín trifosfato |
| IPTG | isopropil- β -D-tiogalactósido |
| kb | kilobases |
| kcal | kilo calorías |
| KCl | cloruro sódico |
| KDa | Kilo Daltones |
| L | litro |
| LB | medio Luria Bertani |
| MALDI-TOF-MS | por sus siglas en inglés “matrix x-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry” |
| mdeg | miligrados (por sus siglas en inglés “millidegrees”) |
| mg | miligramos |
| MgCl ₂ | cloruro magnésico |
| MgSO ₄ | sulfato magnésico |
| MnSO ₄ | sulfato manganésico |
| mL | mililitro |
| mm | milímetros |
| mM | milimolar |
| NaCl | cloruro sódico |
| Na ₂ CO ₃ | carbonato sódico |
| NaH ₂ PO ₄ | bifosfato sódico |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | |
|---|---|
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | bifosfato sódico dihidratado |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O | bifosfato sódico hidratado |
| ng | nanogramos |
| NH ₄ NO ₃ | nitrato de amonio |
| NiCl ₂ | cloruro níquelico |
| nm | nanómetros |
| ONPG | O-nitrofenol-β-galactósido |
| PBS | por sus siglas en inglés “phosphate buffer saline” |
| PCR | por sus siglas en inglés “polymerase chain reaction” |
| pb | pares de bases |
| pH | concentración de protones |
| PMSF | fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| SDS | dodecil sulfato sódico |
| TAP | por sus siglas en inglés “tandem affinity purification” |
| Tris-HCl | trisaminometano-ácido clorhídrico |
| U | unidad |
| X-gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido |

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa institucional de formación de Investigadores (PIFI) por su apoyo a la investigación mexicana.

A mis directores de tesis Dr. Xianwu Guo y Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez, por su guía y apoyo en mi formación profesional.

Al personal académico del Centro de Biotecnología Genómica (CBG) por ayudar en mi formación profesional.

A los miembros del laboratorio de Biomedicina Molecular y de laboratorio de Biotecnología Genómica del CBG, por el aporte de sus conocimientos.

A la Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza, titular del Laboratorio de Investigación Bioquímica de la ENMH, por su apoyo, guía y amabilidad en mi trabajo experimental.

DEDICATORIA

Esta Tesis la dedico en primera instancia al Ser Supremo que me ha creado y con quien estoy infinitamente agradecida. Así mismo, la dedico a mi madre Ma. Carmen Gurrola Betancourt por su valentía, dedicación, esfuerzo, cariño y por ser mi motor de vida; a mi amada abuelita Julia Betancourt Cervantes, que es la estrella que guía mis pasos y que me espera para reunirme con ella en algún momento de mi existir; a cada miembro de mi familia por su apoyo y cariño; y a mis amigos, esa familia que puede escogerse: P. José Hilario García Mendoza, Isabel Cristina Rodríguez Luna y Alejandro Sánchez Varela.

RESUMEN

La bacteria *Helicobacter pylori* presenta una prevalencia mundial mayor al 50%. El patógeno es uno de los agentes etiológicos de gastritis crónica, úlcera péptica y úlcera duodenal. Además es considerado un agente cancerígeno por la OMS. A diferencia del resto de bacterias, en *H. pylori* la proteína del citoesqueleto homóloga a actina, MreB, no participa en la morfogénesis celular. Sin embargo, esta proteína disminuye la actividad de la ureasa. Actualmente, el complejo de proteínas asociadas a MreB no ha sido analizado en *H. pylori*, por lo que esta investigación tiene como finalidad estudiarlo por primera vez y analizar el papel de esta proteína en la patogénesis de *H. pylori*. En la presente investigación se identificaron mediante “pull-down” asociado a espectrometría de masas, 86 proteínas de interacción con MreB de *H. pylori* 26695, entre las que figuraron 9 factores de virulencia (UreB, VacA, ThrC, HydB, HylB, KatA, TsaA, GroEL y SpeA). Se confirmó *in vitro* usando la técnica de doble híbrido en bacteria, la interacción de MreB con 6 proteínas del complejo (UreB, VacA, HydB, HylB, AddA y MreB) y se descartó la interacción con MreC. Además, se determinaron *in silico* las interfaces de interacción de MreB con UreB y VacA. El conjunto de resultados fue congruente con la hipótesis que supone que MreB de *H. pylori*, podría tener un papel en la patogénesis de la bacteria.

ABSTRACT

The bacterium *Helicobacter pylori* infects more than 50% of the population worldwide. The pathogen is one of the etiological agents of chronic gastritis, peptic ulcer and duodenal ulcer. It is also considered as a carcinogenic agent by OMS. Unlike the other bacteria, in *H. pylori*, the cytoskeleton protein homologous to actin, MreB, does not participate in cellular morphogenesis. However, this protein decreases the activity of urease. These features indicate that MreB in *H. pylori* could have different functions or protein-protein interactions. Currently, the protein complex associated with MreB has not been analyzed in *H. pylori*, so this research aims to study it for the first time and analyze the role of this protein in the pathogenesis of *H. pylori*. In the present investigation, 86 interacting proteins with MreB of *H. pylori* 26695, including 9 virulence factors (UreB, VacA, ThrC, HydB, HylB, KatA, TsaA, GroEL and SpeA) were identified by pull-down assay associated to mass spectrometry. It was confirmed *in vitro* using the double hybrid technique in bacteria the direct interactions of MreB with 6 complex proteins (UreB, VacA, HydB, HylB, AddA and MreB) and the interaction with MreC was rejected. In addition, the interaction interfaces of MreB with two important virulence factors, UreB and VacA, were determined *in silico*. The results were congruent with the hypothesis that *H. pylori* MreB could have an important role in the pathogenesis of the bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

La bacteria *Helicobacter pylori* presenta una prevalencia mundial mayor al 50%. El patógeno es uno de los agentes etiológicos de gastritis crónica, úlcera péptica y úlcera duodenal. Esta bacteria es considerada un agente cancerígeno por la Agencia de Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ya que es un factor de riesgo para el adenocarcinoma gástrico y el linfoma asociado a la mucosa.

H. pylori, al igual que las células eucariotas y el resto de las bacterias, posee un citoesqueleto. Dentro del citoesqueleto bacteriano se encuentra una proteína homóloga a la actina eucariota, denominada MreB. Esta proteína tiene diversas funciones tales como participar en la forma, viabilidad y división celular, en la segregación del cromosoma, en la morfogénesis, la remodelación de la pared celular y en la localización de la maquinaria de replicación cromosómica. Sin embargo, MreB en *H. pylori* no es responsable de la morfogénesis celular. Por otro lado se ha encontrado que la proteína disminuye la actividad de la ureasa, enzima esencial en la colonización de la bacteria en el huésped.

Actualmente, el complejo de proteínas asociadas a MreB no ha sido analizado en *H. pylori*, por lo que esta investigación tiene como finalidad estudiarlo por primera vez y analizar el papel de esta proteína en la patogénesis de *H. pylori*.

En la presente investigación se identificaron mediante “pull-down” asociado a espectrometría de masas, 86 proteínas de interacción con MreB de *H. pylori* 26695, entre las que figuraron 9 factores de virulencia (UreB, VacA, ThrC, HydB, HylB, KatA, TsaA, GroEL y SpeA). Se confirmó *in vitro* usando la técnica de doble híbrido en bacteria, la interacción de MreB con 6 proteínas del complejo (UreB, VacA, HydB, HylB, AddA y MreB) y se descartó la interacción con MreC. Además, se determinaron *in silico* las interfaces de interacción de MreB con UreB y VacA. El conjunto de resultados fue congruente con la hipótesis que supone que MreB de *H. pylori* podría tener un papel en la patogénesis de la bacteria.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Helicobacter pylori* COMO PATÓGENO DEL HUMANO

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, altamente móvil, de forma de espiral; mide de 0.2–1.2 μm de ancho X 1.5–10.01 μm de longitud y presenta de 5 a 6 flagelos polares. En condiciones de laboratorio crece en condiciones microaeróbicas a 37 °C (Goodwin *et al.*, 1989).

Esta bacteria fue descubierta en 1982 por los investigadores australianos Barry J. Marshall y Robin Warren; quienes por tal motivo obtuvieron el Premio Nobel de Medicina en el año 2005 (Marshall y Warren, 1984). Originalmente, el microorganismo se clasificó dentro del género *Campylobacter* y fue denominado *Campylobacter pyloridis*. Posteriormente, se renombró a *Campylobacter pylori* siguiendo las normas de la nomenclatura bacteriana. Años más tarde, el análisis de las secuencias de ARNr 16S mostró que *C. pylori* era distante filogenéticamente del género *Campylobacter*, lo que aunado a las diferencias morfológicas de la nueva especie y el diferente patrón de ácidos grasos, ponía en duda la inclusión de *C. pylori* dentro del género *Campylobacter*. (Romaniuk *et al.*, 1987), por lo que se clasificó y nombró como *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al.*, 1989).

El tracto gastrointestinal de más del 50% de la población a nivel mundial es colonizado por *H. pylori* (Eppinger *et al.*, 2004), lo que coloca a la bacteria como el principal agente etiológico de la gastritis crónica, la úlcera péptica y duodenal. Así mismo, el patógeno es considerado por la Agencia de Investigación en Cáncer de la OMS como un factor de riesgo para el adenocarcinoma gástrico y el linfoma asociado a la mucosa ó MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) (Farnbacher *et al.*, 2010). Sin embargo, sólo un 30% de los individuos infectados por el microorganismo se refieren sintomáticos (Das y Paul, 2007).

2.2 TRANSMISIÓN, PREVALENCIA E INFECCIÓN POR *H. pylori*.

Se ha propuesto que la transmisión de *H. pylori* se efectúa mediante la vía gastro-oral, oral-oral y fecal-oral, debido a que se ha encontrado a la bacteria en saliva, placa dental y heces fecales del humano. La propuesta de que la transmisión del patógeno puede ser gastro-oral se apoya en que se ha propagado la infección de esta bacteria por la sanitización inadecuada de gastroscopios (Akamatsu *et al.*, 1996). Otra evidencia que sustenta el tipo de transmisión del microorganismo, radica en la posibilidad de cultivo de la bacteria a partir de muestras de la cavidad oral (Axon, 1995), así como su identificación en heces mediante la técnica de PCR (Nilsson *et al.*, 1996).

Estudios epidemiológicos señalan que la infección por esta bacteria se relaciona con varios factores, entre los que se encuentra el grado de desarrollo de un país. Los países en vías de desarrollo presentan alrededor de un 80% de individuos infectados por el patógeno, mientras que los países industrializados mantienen entre un 20 a 50% de infección en la población (Figura 1) (Suerbaum y Michetti, 2007). Así mismo, la población mayormente infectada (80%) por esta bacteria, son los infantes menores de 10 años (Huynh, 2007) y el 50% de ellos habitan en países en vías de desarrollo (Das y Paul, 2007). Otros factores epidemiológicos asociados a la infección por *H. pylori* son la higiene y los hábitos alimenticios. Se ha reportado que aquellos individuos con una dieta alta en sal, escasa en vitamina C, con un elevado consumo de alcohol y nicotina, incrementan la posibilidad de ser infectados por el microorganismo (Pacheco *et al.*, 2008).

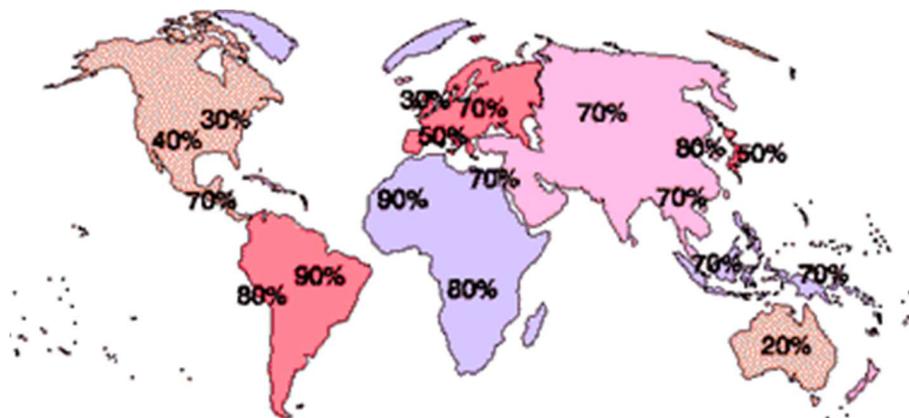


Figura 1. Epidemiología de la infección causada por *Helicobacter pylori* a nivel mundial. Los países en vías de desarrollo presentan alrededor de un 80% de la población infectada por la bacteria, mientras que los industrializados entre un 20% y 50%.

H. pylori emplea varios factores de virulencia para colonizar la cavidad gástrica (Figura 2). Los flagelos le permiten movilizarse a través de la capa mucosa del estómago, mientras que la enzima ureasa cataliza la conversión de urea en CO_2 y NH_4NO_3 , a fin de neutralizar el pH ácido que la circunda (Khan *et al.*, 2009). Para adherirse a las células epiteliales el patógeno utiliza diversas proteínas de membrana externa y adhesinas, siendo la más caracterizada la adhesina BabA. Una característica de esta adhesina es que se une al antígeno de Lewis B, mismo que es fucosilado para evitar que la bacteria sea reconocida por el sistema inmune del huésped (Suerbaum y Michetti, 2007). Una vez que *H. pylori* se ha unido a las células epiteliales secreta toxinas hacia el interior de éstas, provocando alteraciones y/o la muerte de las mismas (Khan *et al.*, 2009).

Una de las toxinas que la bacteria introduce a las células del epitelio es la denominada VacA (vacuolating cytotoxin), que es secretada mediante el sistema de secreción tipo V. Esta toxina presenta una señal en la secuencia que le permite insertarse en la membrana de las células estomacales, provocando la formación de invaginaciones que resultan en la vacuolización del citoplasma. Una vez insertada en la membrana de las células hospedadas, VacA actúa como un canal de cloro, provocando la formación de vacuolas ácidas y la muerte de las mismas mediante apoptosis. La actividad apoptótica de VacA se

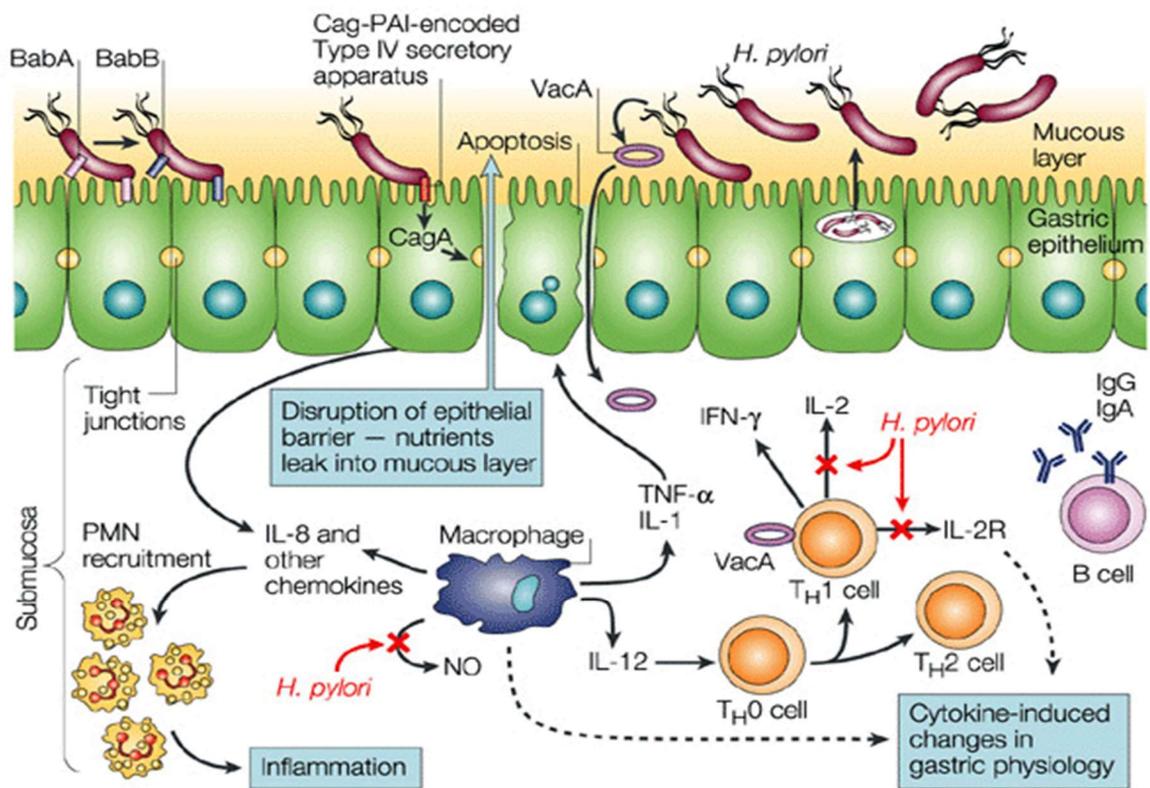
debe a que reduce el potencial de la membrana interna mitocondrial, induce la liberación de citocromo C y se asocia con el factor de necrosis tumoral (TNF) de las células del epitelio. Por otra parte, se han identificado diversas cepas de *H. pylori* con variaciones alélicas del gen *vacA* en la región correspondiente a la secuencia señal de la proteína, denominadas s1 ó s2. Si las variaciones de este gen se localizan en la región media de la secuencia señal, se denominan m1 ó m2 (Basso *et al.*, 2008). Se ha observado que cuando las cepas contienen la variante s2/m2, VacA no provoca citotoxicidad en el epitelio gástrico; mientras que las variantes s1/m1 ó s1/m2 resultan en una infección severa, pudiéndose generar úlcera péptica (Akhter *et al.*, 2007).

CagA (Cytotoxin protein) es otra toxina que el patógeno interioriza en el epitelio gástrico empleando el sistema de secreción tipo IV (Qiao *et al.*, 2007). Al localizarse la proteína dentro de las células gástricas se favorece la producción de factores pro-inflamatorios en el epitelio, tales como la interleucina-8. Estos factores reclutan células polimorfonucleares (PMNs), desencadenando el proceso inflamatorio. En la colonización crónica de la cavidad gástrica por *H. pylori*, CagA puede causar la ruptura de la barrera epitelial, un rearrreglo anormal de la actina del citoesqueleto y actuar como una oncoproteína antiapoptótica (por lo que se le ha relacionado con el cáncer gástrico). La ruptura de las uniones celulares provoca el filtrado de nutrientes dentro de la capa mucosa y la entrada de VacA en la submucosa. Además, las citosinas (IL-12) producidas por los macrófagos a consecuencia de la infección por el patógeno, activan a los linfocitos T_{H0}, T_{H1} y T_{H2}, en respuesta al daño. Las citosinas también inducen cambios en la secreción de ácido gástrico y la homeostasis del epitelio. *H. pylori* inhibe la respuesta inmune del huésped bloqueando la producción de óxido nítrico de los macrófagos y permitiendo que VacA interfiera en la señalización de interleucina-2 (IL-2) en la activación de las células, mediante el bloqueo de la transcripción de IL-2 y de su receptor (Monack *et al.*, 2004).

Por otra parte, el gen *cagA* (cytotoxin associated) debe su nombre a la correlación que presenta con la toxina VacA. Considerando la relación entre estas dos toxinas, las cepas de *H. pylori* pueden clasificarse en dos patotipos. El patotipo I contiene *cagA* y secreta la forma tóxica de VacA, mientras que en el patotipo II la bacteria carece de *cagA* y secreta

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

la forma no tóxica de VacA. El gen *cagA* se encuentra localizado en una secuencia del ADN de la bacteria compuesta por 31 genes de virulencia denominada Isla de Patogenicidad Cag. Se ha comprobado en diversos aislados clínicos que aquellas cepas de *H. pylori* que presentan el gen *cagA* y que secretan alguna de las variantes tóxicas de VacA, son agentes causales de úlcera péptica y cáncer gástrico en el huésped (Akhter *et al.*, 2007).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 2. Colonización de la cavidad gástrica del humano por *H. pylori*. Mediante diversos factores de virulencia el patógeno infecta el epitelio gástrico del huésped. La bacteria emplea el movimiento flagelar para desplazarse a través de la mucosa, evitando ser dañada por el ácido estomacal mediante la acción catalítica de la ureasa. Dentro de las

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

células epiteliales, el microorganismo secreta las toxinas VacA y CagA, provocando daño y muerte celular y desencadenando un proceso inflamatorio en el huésped mediante la activación de diversas citosinas (Figura tomada de Monack *et al.*, 2004).

2.3 GENOMAS SECUENCIADOS DE *H. pylori*.

H. pylori es la primera bacteria de donde se han obtenido y secuenciado dos aislados independientes; secuenciándose por primera vez las cepas 26695 y J99. La cepa 26695 fue aislada a partir de un individuo con gastritis crónica en el Instituto de Investigaciones Genómicas de Estados Unidos de Norte América (TIGR por sus siglas en inglés: The Institute for Genomic Research) (Tomb *et al.*, 1997). La cepa J99, fue aislada por la empresa Genome Therapeutics Co. en alianza con Astra Zeneca, a partir de un paciente con úlcera duodenal (Alm *et al.*, 1999). Se han seguido secuenciando genomas de *H. pylori*, dando un total de 889 genomas a la fecha (Entrez Genome, abril 2018).

Respecto a la cepa 26695 de *H. pylori*, su genoma presenta una longitud de 1,667,867 pb. Presenta un total de 1630 genes, de los cuales 1587 codifican para proteínas, 36 para ARNt y 7 para ARNr (Tomb *et al.*, 1997). Contiene las variantes alélicas de *vacA s1m2*. La isla de patogenicidad Cag de esta cepa es de 37,388 pb, cuyo bajo contenido de G+C sugiere que se adquiere mediante transferencia horizontal (Azuma *et al.*, 2004).

2.4 CITOESQUELETO EUCARIOTA

En 1903, Nikolai Konstantinovich Koltsov propuso que la forma de las células estaba determinada por una red de tubos intracelulares denominados en conjunto “citoesqueleto”; término que fue acuñado por Paul Wintrebert en 1929 (Frixione, 2000).

En las células de los organismos eucariotas, existen estructuras proteicas subcelulares filamentosas que dan forma a la célula, permiten el transporte de vesículas, participan en la división celular y dan soporte a los organelos, entre otras funciones. Al conjunto de

estas estructuras se le denomina citoesqueleto y se encuentra formado por tres elementos denominados microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios.

2.4.1 Microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras que contienen protofilamentos conformados por polímeros compuestos de heterodímeros de α y β tubulina. Son altamente dinámicos y miden 25 nm de diámetro (Figura 3 a y b). Los microtúbulos contienen un extremo positivo (+) y otro negativo (-). En el polo positivo, se encuentra expuesta la subunidad β de la tubulina, mientras que en el negativo la subunidad α . El crecimiento o polimerización de los microtúbulos ocurre en el polo positivo y es llevada a cabo por la hidrólisis de GTP; mientras que la despolimerización ocurre en el extremo (-) con la unión de la α tubulina a GDP, creando una inestabilidad dinámica (Figura 3c) (Lodish *et al.*, 2000).

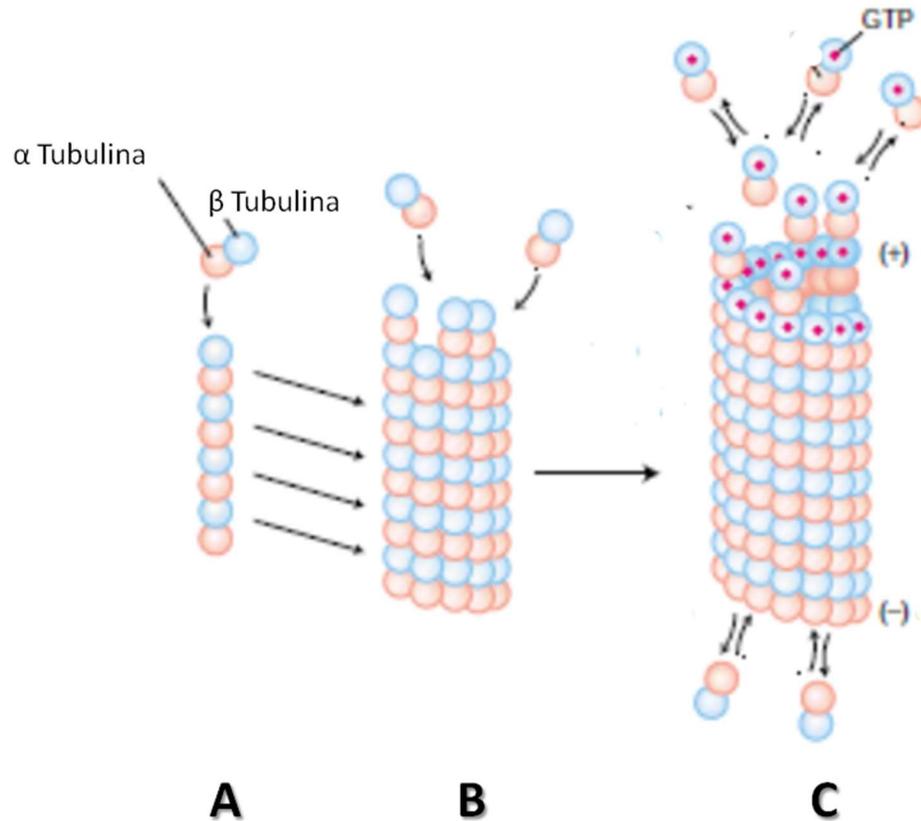


Figura 3. Conformación y dinámica de los microtúbulos. A) Cada protofilamento está conformado por heterodímeros de α y β tubulina. B) El microtúbulo se va estructurando mediante la unión de los protofilamentos. C) La polimerización en el extremo (+) del microtúbulo es llevada a cabo por la hidrólisis de GTP. La despolimerización se da en el extremo (-) por la unión a GDP. (Figura modificada de Lodish *et al.*, 2000).

La funcionalidad de los microtúbulos radica en que estas estructuras emergentes de los centros organizadores de microtúbulos o MTOC (microtubule organizing center), participan en la formación del huso mitótico, en la motilidad celular al formar parte de cilios y flagelos eucarióticos y en el transporte celular. Respecto a esta última función, las proteínas motoras dineína y quinesina utilizan a los microtúbulos a manera de “rieles”

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

para transportar vesículas a lo largo de la célula en sentidos opuestos (Figura 4) (Lodish *et al.*; 2000).

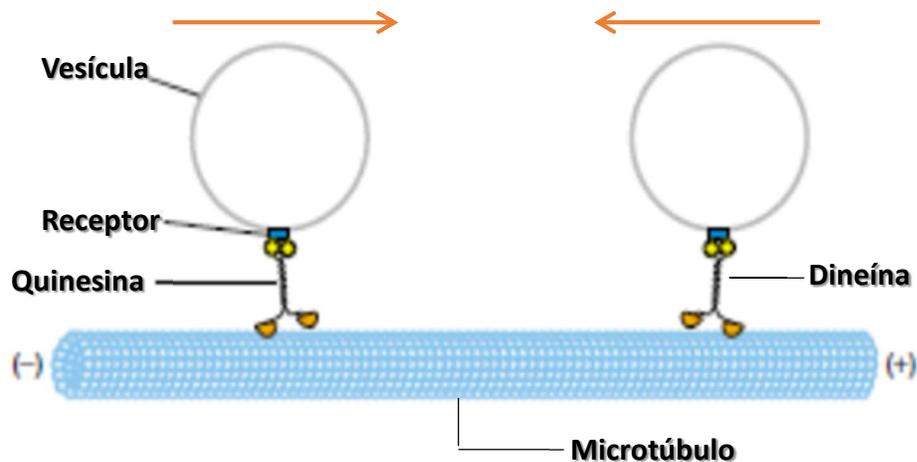


Figura 4. Proteínas motoras. Las quinesina y dineína utilizan al microtúbulo a manera de “riel” para transportar vesículas en sentidos opuestos en las células eucariotas (Figura modificada de Lodish, *et al.*, 2000).

2.4.2 Filamentos de actina

En 1942, Brúnó F. Straub extrajo una proteína muscular, que posteriormente denominó actina por el efecto activador que presenta al interaccionar con la miosina en el músculo (Straub y Feuer, 1950). La actina es la proteína globular (G actina) más abundante dentro de las células eucariotas y capaz de formar filamentos (F actina). La proteína puede unirse a ATP o a ADP generando 4 estados denominados G actina-ATP, G actina-ADP, F actina-ATP y F actina-ADP. La importancia de estos estados radica en el ensamblaje de los filamentos de actina, que es llevado a cabo mediante la hidrólisis de ATP. El primer paso

para el ensamblaje de los filamentos es la nucleación, donde la G actina formará un agregado que servirá de patrón para polimerización cada filamento (Figura 5). Esta polimerización se presenta con mayor rapidez en el extremo (+) de manera similar que en los microtúbulos (Lodish *et al.*, 2000). Para que pueda formarse un filamento de actina, es necesario que los monómeros de G actina se dispongan en una posición plana y giren entre sí. Un proceso similar es llevado a cabo en el citoesqueleto procariota, en donde juega un papel principal una proteína homóloga a la actina eucariota (Oda, *et al.*, 2009), descrita posteriormente.

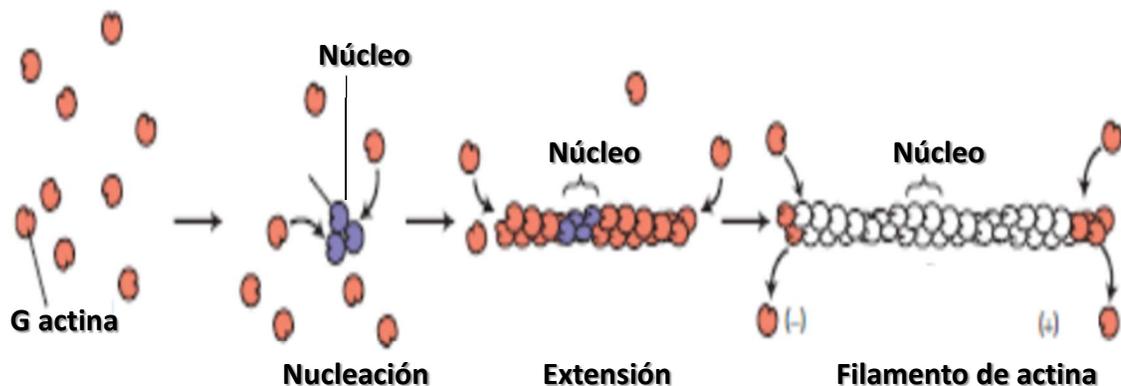


Figura 5. Ensamblaje de los filamentos de actina. La formación de F actina comienza al disponerse la G actina en un núcleo, mismo que servirá de patrón para la extensión del filamento de actina. La polimerización del filamento es efectuada en el extremo positivo del mismo (Figura modificada de Lodish *et al.*, 2000).

Los filamentos de actina presentan funciones que incluyen el mantenimiento y reorganización de la forma celular y del núcleo (Figura 6), la participación en la citocinesis al formar un anillo contráctil en la zona ecuatorial de la célula y permitiendo la interacción

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

célula-célula en el intestino mediante uniones adherentes, desmosomas y hemidesmosomas, además de formar las microvellosidades del mismo (Alberts *et al.*, 2008) (Figura 7).

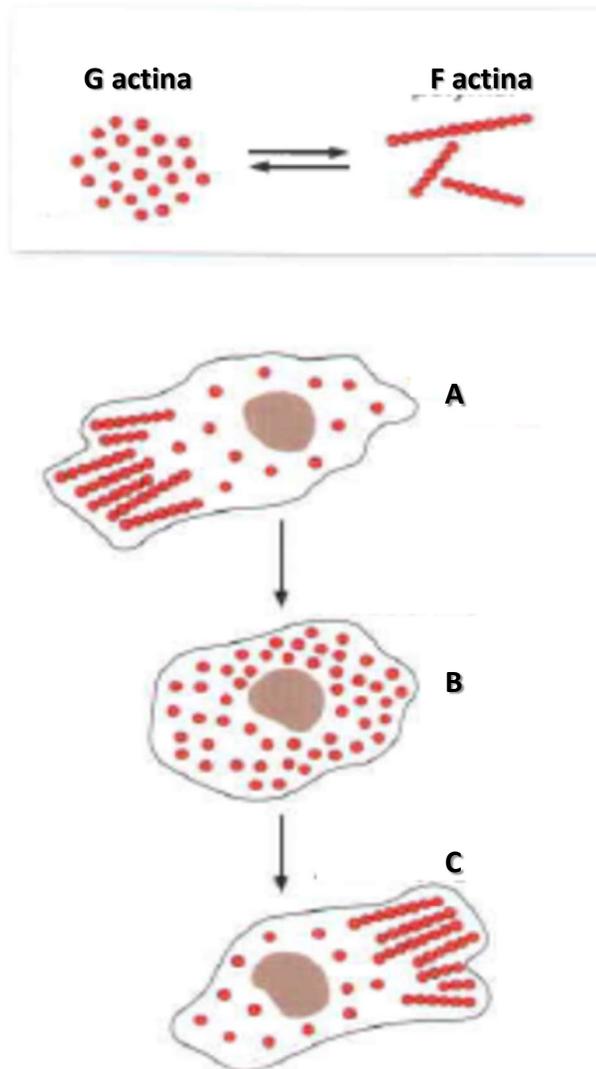


Figura 6. Mantenimiento y reorganización de la forma celular por los filamentos de actina. A) Los filamentos de actina pueden mantener la forma de la célula permaneciendo tanto como G o F actina. B) La G actina se distribuye en la célula, dando

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

paso a la reorganización de la forma celular. C) La interconversión de G actina a F actina y viceversa, origina cambios en la forma original de la célula (Figura modificada de Alberts *et al.*, 2008).

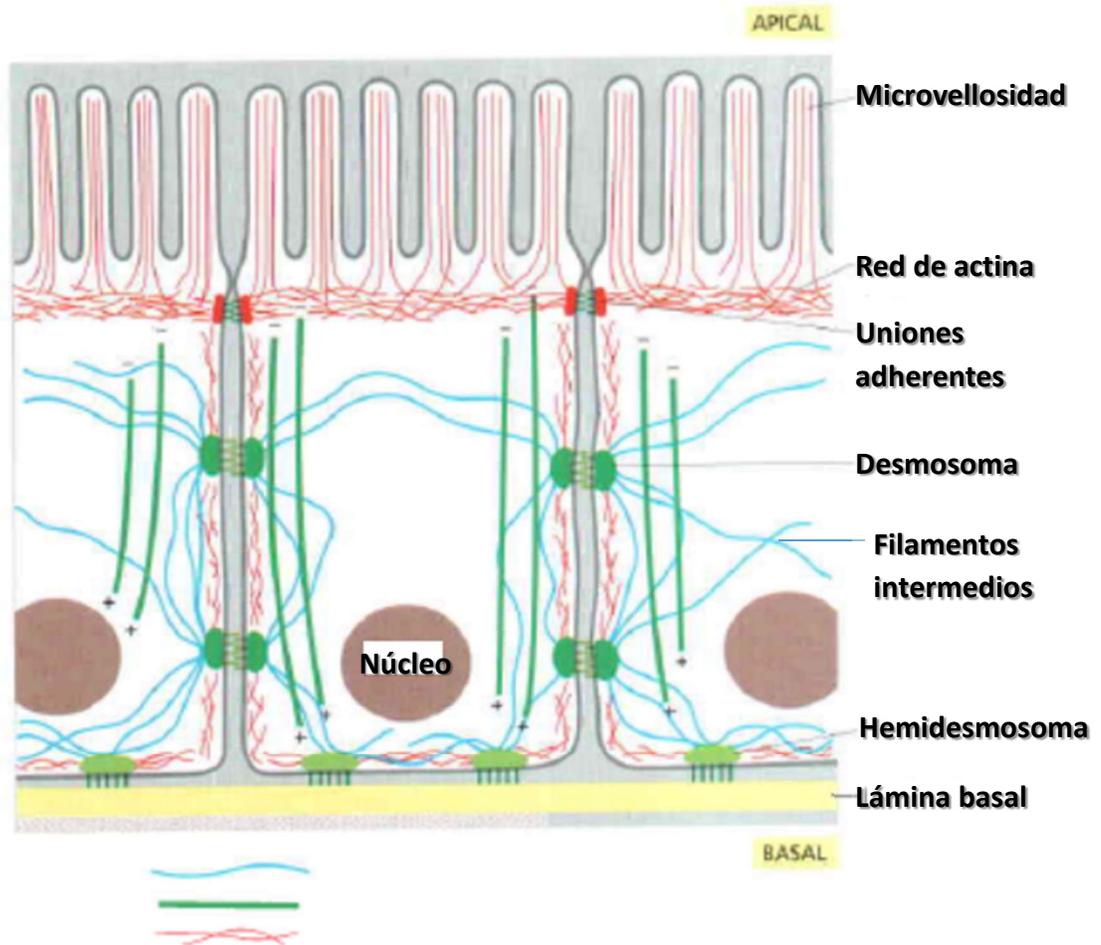


Figura 7. Funciones de los filamentos de actina en el las células intestinales. Los filamentos de actina forman las microvellosidades intestinales y comunican a las células epiteliales mediante uniones adherentes, desmosomas (hacia la parte lateral de la célula) y hemidesmosomas (hacia la lámina basal) (Figura modificada de Alberts *et al.*, 2008).

2.4.3 Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios constituyen el tercer elemento del citoesqueleto y se conforman por proteínas específicas que varían dependiendo del tipo celular del que se trate. Ejemplos de proteínas que estructuran a los filamentos intermedios abarcan las lamininas A, B y C y la queratina en células epiteliales, la vimentina en células de origen mesenquimal, desmina en células musculares, GFAP (glial fibrillary acidic protein) en astrocitos y algunas células de Schwann, periferina en algunas neuronas, etc. Los monómeros de los filamentos intermedios presentan un dominio central extendido en forma de α -hélice que se asocia paralelamente con otro monómero. Cada par de dímeros unidos en paralelo forman un tetrámero y con la unión de 32 monómeros se estructura un filamento intermedio de 10 nm de grosor (Alberts *et al.*, 2008) (Figura 8).

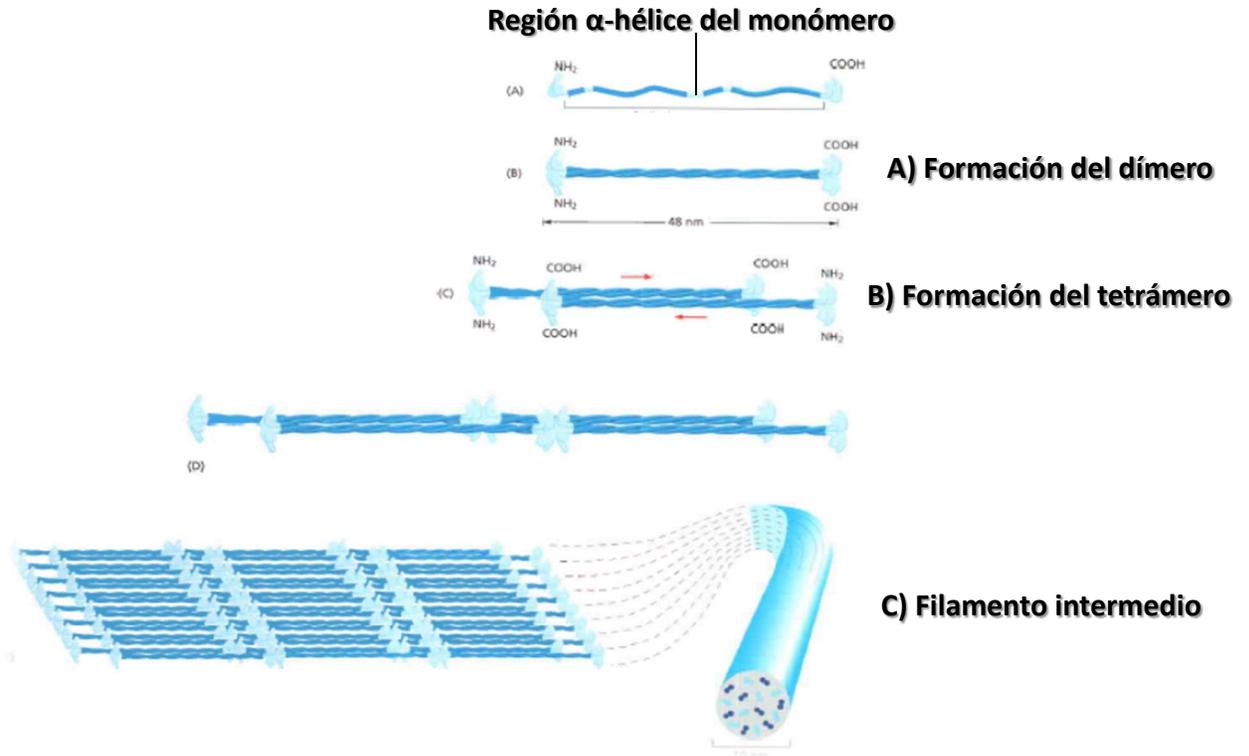


Figura 8. Formación de un filamento intermedio. Cada monómero presenta una región α -hélice en donde se une en paralelo a otro monómero formando un dímero (A). Cada par de dímeros se asocia en forma antiparalela, formando un tetrámero (B). Cada par de tetrámeros se irá uniendo con otros hasta formar un filamento intermedio (C) (Figura modificada de Alberts *et al.*, 2008).

Se conoce poco respecto al mecanismo de ensamblaje de los filamentos intermedios ya que, a diferencia de los microtúbulos y los filamentos de actina, los filamentos intermedios no presentan ningún sitio de unión hacia algún nucleósido trifosfatado. Sin embargo, bajo condiciones normales, la fosforilación de las proteínas que forman los filamentos intermedios provoca el desensamble de los mismos (Alberts *et al.*, 2008).

2.5 CITOESQUELETO BACTERIANO

Al igual que en las células eucariotas, los organismos procarióticos presentan un citoesqueleto compuesto por diversos polímeros proteicos. Sin embargo, no fue hasta después de 1990 cuando 3 grupos de investigadores reportaron, de manera independiente, la existencia del citoesqueleto en procariotas. De este modo, se demostró que la proteína FtsZ, homóloga a la actina eucariota, poseía actividad GTPasa y estaba implicada en la formación del septo durante la división celular de *Escherichia coli* (RayChaudhuri y Park, 1992) y en la formación un anillo contráctil que permitía la citocinesis en la bacteria (Mukherjee *et al.*, 1992). Así mismo, se ha reportó que, otras proteínas homólogas a la actina eucariota (tales como FtsA, ParM y MreB) no presentaban afinidad con GTP, sino que contaban con actividad ATPasa (Bork *et al.*, 1992).

Hasta ese entonces se habían descrito proteínas bacterianas homólogas a dos de los tres componentes del citoesqueleto de los eucariotas. En el año 2003 se reportó en *Caulobacter crescentus* la existencia de una proteína funcionalmente similar a los filamentos intermedios de eucariotas, la cual fue denominada crescentina. Esta proteína permitía que *C. crescentus* adquiriera su forma helicoidal actuando como un modelador de la forma celular. La crescentina está compuesta por una región central superenrollada flanqueada por 2 dominios a manera de “cabeza” y “cola”. Su polimerización ocurre espontáneamente y no requiere de nucleósidos trifosfatados (Ausmees, *et al.*, 2003). La localización de la crescentina se da en la curvatura interna de *C. crescentus* y le permite adquirir su forma curvada y detener su crecimiento bacilar. Actualmente se sabe que la crescentina redirige la síntesis del péptido glicano para dar forma a la célula, sin embargo, el mecanismo es aún desconocido (Thanbichler y Shapiro, 2008).

2.6 PROTEÍNA MreB.

Como ya se mencionó anteriormente en este trabajo, en 1992 se describió a MreB (morphogenetic rod element) como una proteína similar a la actina de los eucariotas. Sin embargo, en 1989 ya se tenían reportes de la proteína en *E. coli*, donde se describió con un peso molecular de 37 KDa cuya funcionalidad radicaba en el mantenimiento de la forma celular bacteriana (Wachi y Matsubishi, 1989). Fue en el año 2001 que Jones y colaboradores reportaron que MreB presentaba homología a actina (en sus 4 subdominios funcionales) y corroboraron que desempeñaba una función en el mantenimiento de la forma celular. La funcionalidad de la proteína se demostró inhibiendo la expresión del gen *mreB* en *Bacillus subtilis*, resultando en la pérdida de la forma celular y siendo letal para la bacteria. Además, se observó mediante la localización subcelular de MreB en *B. subtilis* que la proteína formaba patrones helicoidales propios de la forma celular de este microorganismo.

MreB, al igual que la actina eucariota, presenta un proceso de polimerización o ensamblaje efectuado con mayor rapidez en el extremo (+) (Figura 9a). De esta manera, MreB forma filamentos que mantienen la forma celular bacteriana (Figura 9b). En *C. crescentus*, el ensamblaje de filamentos de MreB comienza a formarse desde la citocinesis en la división celular (Figura 9c) (Thanbichler y Shapiro, 2008).

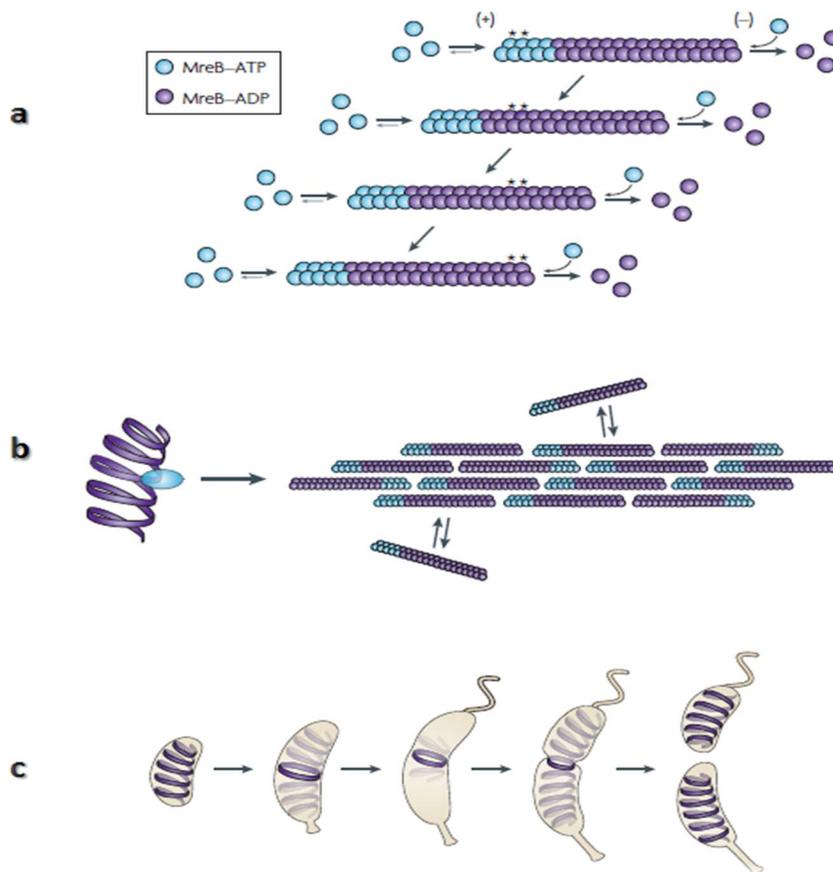


Figura 9. Dinámica de los filamentos de MreB en *Caulobacter crescentus*. a) El ensamblaje de los filamentos de MreB sigue el mismo principio que en los filamentos de actina. MreB polimeriza gracias a la hidrólisis de ATP en el extremo (+), contrario a lo que ocurre en el extremo (-) en donde la proteína se une a ADP. b) Varios filamentos de MreB se unen para dar y mantener la forma celular de la bacteria. c) En *C. crescentus*, la formación de espirales compuestas por filamentos de MreB comienza a originarse en el polo de las células hijas en la división celular (Figura modificada de Thanbichler y Shapiro, 2008).

Se ha encontrado en otras bacterias tales como *Escherichia coli* y *Vibrio parahaemolyticus*, que MreB participa también en el mantenimiento de la forma celular. Además, aunque la mayoría de las bacterias contienen MreB, esta proteína puede presentar varios homólogos en una misma célula (MreB, Mbl y MreBH en *B. subtilis*).

Se han realizado otros estudios que indican la participación de MreB en el mantenimiento de la forma celular bacteriana. MreB se encuentra localizada en el operón *mre*, junto con otros dos elementos morfogenéticos denominados *mreC* y *mreD* (Carballido-López *et al.*, 2006). Kuse y colaboradores en el 2005, reportaron que en *E. coli*, *B. subtilis* y *C. crescentus*, MreB dirigía la síntesis de la pared celular. Además, estos investigadores obtuvieron mediante ensayos de doble híbrido de levadura que MreC interaccionaba con MreB y MreD a fin de mantener la forma celular bacilar y que la misma no se tornara esférica, ya que, excepto para *E. coli*, esta forma celular resulta letal. Por otra parte, Bendezu y colaboradores en el 2009, reportaron que para el mantenimiento de la forma celular en *E. coli*, era necesaria la interacción de un dominio de MreB con RodZ. Estos resultados fueron contrastantes a los encontrados un año antes, en donde se sugirió que RodZ podía formar patrones helicoidales independientes de MreB (Shiomi *et al.*, 2008).

Sin embargo, MreB desempeña otras funciones además de mantener la forma celular bacteriana. Al reducir los niveles de expresión de *mreB* en *B. subtilis*, se ve afectada la segregación del cromosoma y la localización de la maquinaria de replicación (Defeu-Soufo y Graumann, 2005). Por lo que MreB pareciera actuar más como un microtúbulo que como actina.

MreB se ha visto también involucrada en la remodelación de la pared celular. Al colocar a baja concentración un inhibidor reversible (A22) de esta proteína en medio de cultivo para *C. crescentus*, la bacteria pierde su forma celular; mientras que, al retirar el inhibidor retoma su forma original, debido a que MreB parece interactuar con enzimas sintetizadoras del péptido glicano (Takacs *et al.*, 2010). Así mismo, se ha utilizado A22 para inhibir, en niveles no letales, a MreB en *Myxococcus xanthus* y se ha observado que

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

la motilidad se ve disminuida (Mauriello *et al.*, 2010). Cabe mencionar que, A22 es un antibiótico que compite con el sitio de unión a ATP en MreB, por lo que no permite la polimerización de los filamentos de esta proteína (Bean *et al.*, 2009).

2.7 MreB EN *Helicobacter pylori*.

Para una amplia variedad bacteriana, MreB interviene en el mantenimiento de la forma celular y la interrupción de la expresión del gen que la codifica resulta letal. Sin embargo, Waidner y colaboradores en 2009, reportaron que en *H. pylori* 26695, la forma helicoidal dependía de las proteínas Ccrp (coiled coil rich proteins) y no de MreB. El grupo de trabajo reportó también que a diferencia de otras bacterias, en *H. pylori*, *mreB* no era un gen esencial para la viabilidad celular. Sin embargo, en células mutantes negativas para *mreB*, el crecimiento en medio de cultivo se vio disminuido; ya que las células testigo llegaron a una fase exponencial en 8 horas, mientras que las mutantes lo hicieron en 25 horas. Además, confirmaron que esta proteína intervenía en proporcionar longitud celular y que era requerida para la segregación del cromosoma. Así mismo, las mutantes de *H. pylori* para *mreB* presentaron una reducción significativa en la actividad de la ureasa (6 veces menos que la actividad de la ureasa de células testigo). Aunque la actividad de la ureasa pudo ser restaurada con 1 μM de NiCl_2 (factor limitante para la enzima), no es claro aún el mecanismo por el cual la MreB podría afectar la actividad de proteínas de membrana tales como transportadores y que, en ausencia de MreB, puedan cambiar los niveles de algunos iones metálicos.

2.8 INTERACTOMA DE MreB EN *E. coli*

Actualmente, el interactoma para la proteína MreB está descrito únicamente en *E. coli*. En el cromosoma de esta bacteria se insertaron casetes de ADN, a fin de crear una región carboxilo-terminal de afinidad en alelos etiquetados de 1000 marcos de lectura abiertos

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

(equivalentes al 23% del genoma). Como resultado, se obtuvieron 857 proteínas que interactuaban a manera de complejo proteico con MreB (Figura 10). Las proteínas del complejo tienen funciones tales como la morfogénesis celular, asociación ribosomal, transcripción y replicación del cromosoma (Butland *et al.*, 2005).

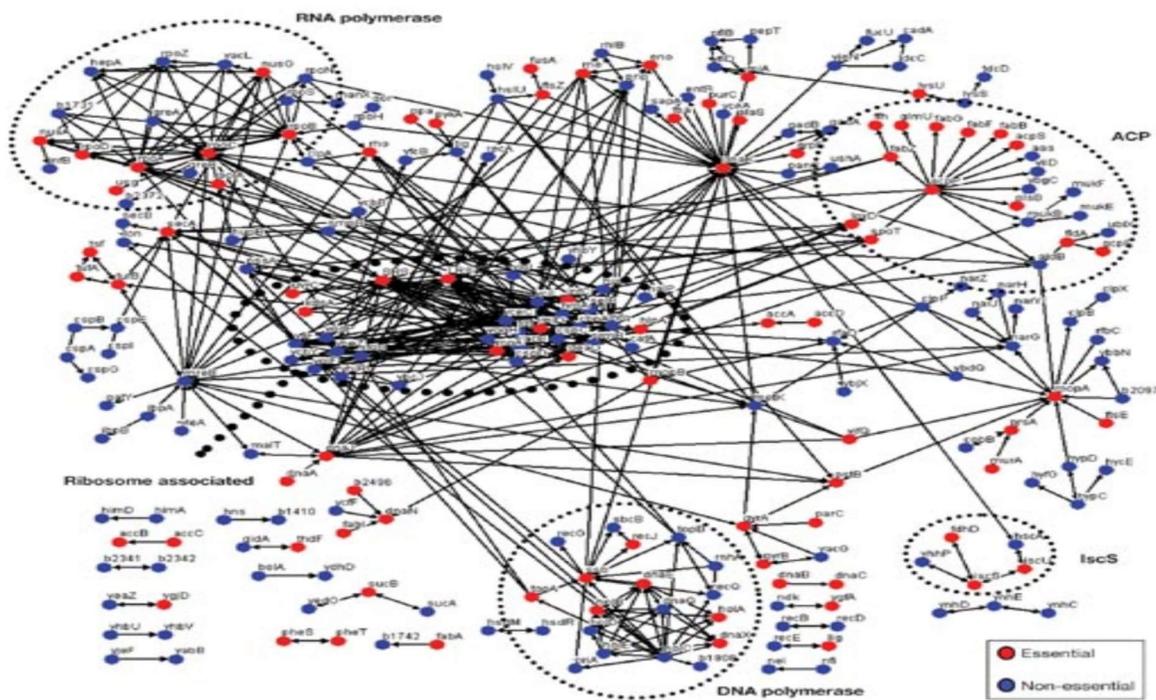


Figura 10. Interactoma de MreB en *Escherichia coli*. La red de interacción muestra que, MreB forma un complejo de asociación con proteínas del tipo de las ADN y ARN polimerasas, así como aquellas que participan en la morfogénesis celular (Figura tomada de Butland *et al.*, 2005).

2.9 INTERACTOMA DE MreB EN *H. pylori*

Debido a que en ninguna de las cepas registradas de *H. pylori* se ha realizado un interactoma de MreB, en este trabajo se analizaron previamente las interacciones de esta

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

proteína en *H. pylori* 26695 mediante métodos bioinformáticos (Figura 11), utilizando la base de datos STRING 10.5. Esto permitió predecir nuevas interacciones entre proteínas que podrían estar conformando un complejo proteico o asociado a un mismo proceso biológico.

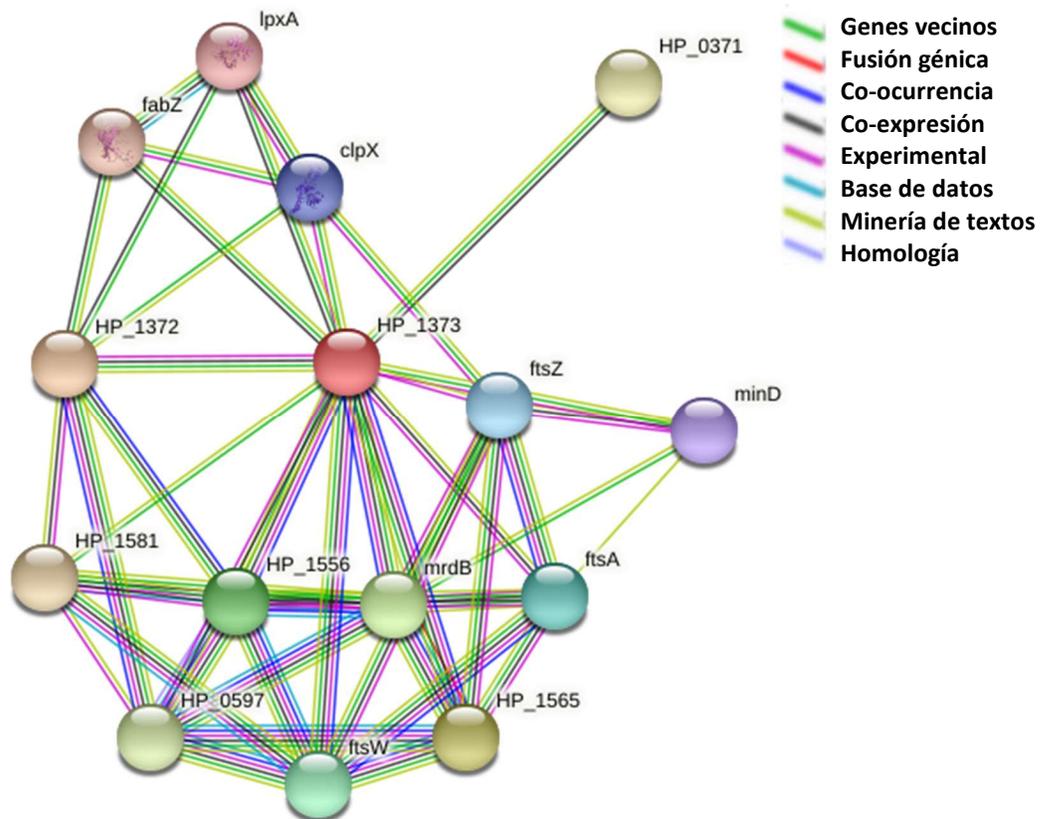


Figura 11. Predicción de las interacciones de MreB con otras proteínas en *H. pylori* 26695 empleando STRING 10.5. Las líneas, dependiendo del color que presentan, indican si las interacciones son predichas respecto a la vecindad, co-ocurrencia o co-expresión de *mreB* con otros genes; si fueron confirmadas experimentalmente o si la interacción está descrita en bases de datos con proteínas homólogas.

Las interacciones predichas en la Figura 10, fueron obtenidas con una puntuación mayor a 0.7 y empleando no más de 50 proteínas como parámetros (Cuadro 1). En las interacciones predichas de manera bioinformática MreB se asocia con MreC, proteína codificada por el gen *mreC*, localizado en el locus *mre*. Junto con MreB y MreD, la proteína MreC participa en la morfogénesis celular en *E. coli* (Kruse *et al.*, 2005). Otras proteínas de interacción obtenidas son PBP2 (Penicillin-binding-protein 2) y PBP1-A, responsables de la síntesis lateral de la pared celular (Kruse *et al.*, 2005). En *E. coli* se ha reportado que PBP2 proporciona direccionalidad al crecimiento de la pared celular, al interaccionar directamente con MreB (Shaevitz y Gitai, 2010). Así mismo, MrdB también conocida como RodA, es una proteína que evita la conversión de una forma bacilar a esférica en algunas bacterias, ya que resultaría letal para la célula. Se ha reportado en *E. coli*, que esta proteína es causante de la sensibilidad de la bacteria a amdinocilina, debido a la afinidad que tiene por este antibiótico (Bendezú y de Boer, 2008). Por su parte, FtsI es una transpeptidasa cuyas funciones en *E. coli* comprenden la síntesis de péptidoglicano y la formación de un anillo contráctil en el septo durante la división celular en conjunto con FtsA, FtsW y FtsZ (Wissel y Weiss, 2004; Thanbichler y Shapiro, 2007; Vats *et al.*, 2009). En relación con el complejo Fts, MinD es una proteína de la superfamilia de las ATPasas, que en *E. coli*, determina la posición de la división celular al interaccionar con FtsZ en la parte media de la célula (Pogliano, 2008). La proteína ClpX, es una chaperona que actúa a manera de subunidad reguladora de la proteasa dependiente de ATP ClpXP, que a su vez, es responsable de la remodelación y de la degradación proteica (Kim y Kim, 2003). Tres proteínas responsables de la biosíntesis de lípidos aparecen en el complejo de interacción con MreB. La primera es LpxA, cuyo gen se ha reportado como esencial y se ha confirmado su participación en los primeros pasos de esta ruta metabólica en Gram negativas (Zarantonelli *et al.*, 2003). FabZ y FabE mantienen también un papel bien descrito en esta ruta biosintética (He *et al.*, 2009) y su interacción con LpxA se ha confirmado en *Neisseria meningitidis* (Zarantonelli *et al.*, 2003). Por otra parte, Llm es una proteína que confiere resistencia a meticilina en Gram positivas y negativas. Su función se ha asociado a la expresión del complejo de proteínas PBP en *Staphylococcus aureus* (Stapleton y Taylor, 2002). Las interacciones de la mayoría de estas proteínas con MreB han sido confirmadas experimentalmente en *E. coli*, más no *H. pylori*, sustentando

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

en cierta medida, que MreB no participa en proporcionar la forma celular en esta bacteria (Waidner *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Interacciones de MreB en *Helicobacter pylori* 26695 predichas en String 10.5.

| GEN | PROTEÍNA | PUNTUACIÓN | INTERACCIONES CON MreB CONFIRMADAS |
|---------|----------|------------|------------------------------------|
| HP_1373 | MreB | | |
| HP_1372 | MreC | 0.997 | <i>Escherichia coli</i> |
| HP_1565 | PBP2 | 0.974 | <i>Escherichia coli</i> |
| | MrdB | 0.966 | <i>Escherichia coli</i> |
| HP_1556 | FtsI | 0.966 | <i>Escherichia coli</i> |
| | FtsW | 0.924 | <i>Escherichia coli</i> |
| | FtsA | 0.882 | <i>Escherichia coli</i> |
| | FtsZ | 0.878 | <i>Escherichia coli</i> |
| | ClpX | 0.878 | <i>Escherichia coli</i> |
| | MinD | 0.847 | <i>Escherichia coli</i> |
| | LpxA | 0.835 | |
| | FabZ | 0.828 | |
| HP_1581 | Llm | 0.795 | |
| HP_0371 | FabE | 0.773 | |
| HP_0597 | PBP1-A | 0.738 | <i>Escherichia coli</i> |

2.10 MÉTODOS EXPERIMENTALES PARA DETECCIÓN DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

Las interacciones entre proteínas pueden comprobarse no sólo por métodos bioinformáticos, sino también mediante métodos experimentalmente. Existen diferentes técnicas para comprobar de manera experimental estas interacciones, tales como métodos asociados a la fluorescencia la coimmunoprecipitación, , la técnica de doble híbrido de levadura, la purificación en tándem de proteínas o TAP (Tandem Affinity Purification) y el método de interacción proteína-proteína (en lo sucesivo “pull-down”).

La TAP (Figura 12) es una técnica *in vivo* que radica en el aislamiento de complejos proteicos al fusionar la proteína de interés, ya sea en la parte amino o carboxilo terminal, con una etiqueta TAP; dentro del organismo de interés. La etiqueta está compuesta de dos epítopes diferentes y un sitio de corte para una proteasa para permitir su purificación. Así, el complejo de interacción unido a la proteína etiquetada se coloca en una columna de afinidad recubierta con inmunoglobulinas anti TAP. Posteriormente se agrega una proteasa que despende al complejo, mismo que se hace pasar por una segunda columna recubierta con calmodulina. Las proteínas que no forman parte del complejo de interacción son retiradas y las que lo conforman son eluidas mediante un agente quelante (EDTA) del calcio de la calmodulina. Para identificar las proteínas resultantes, esta técnica se emplea en conjunto con espectrometría de masas (Günzl y Schimanski, 2009).

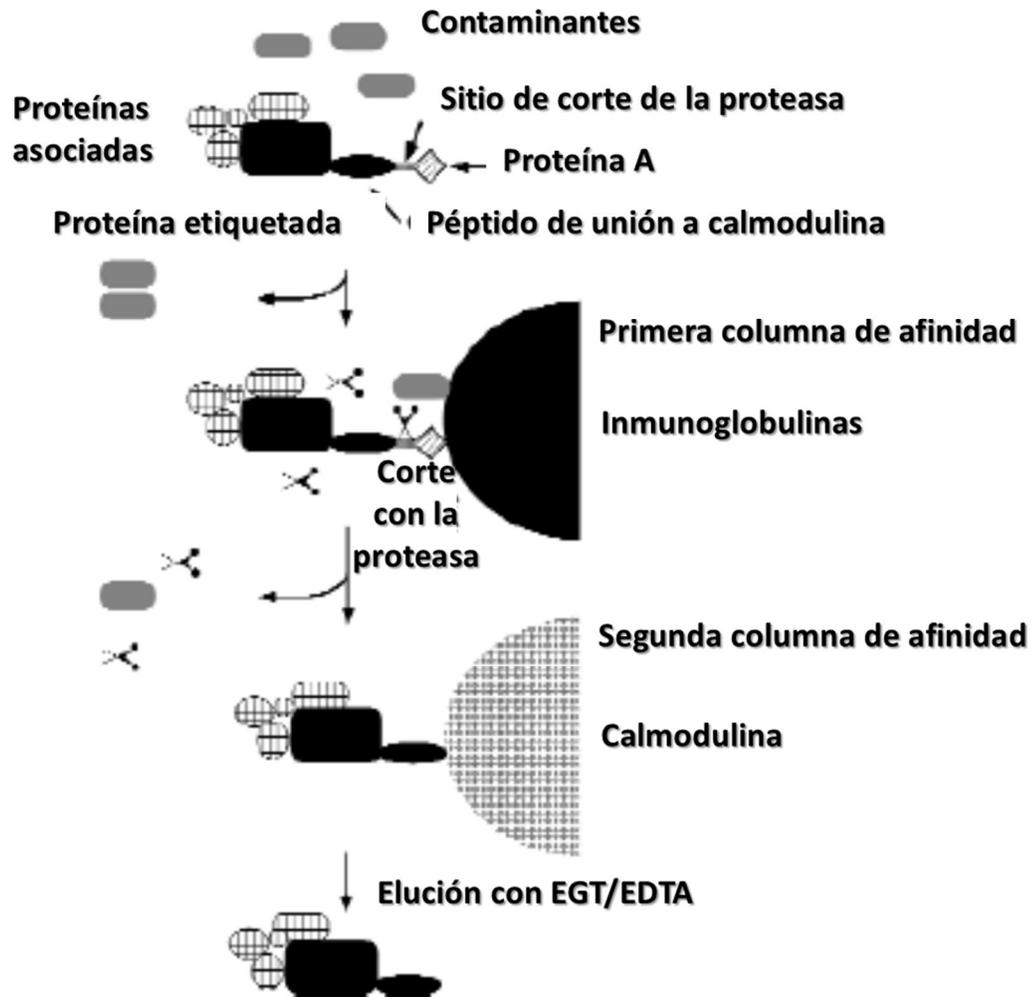


Figura 12. Purificación en tándem de proteínas. La figura muestra la técnica de TAP. En una primer columna se hace pasar por una columna de afinidad con inmunoglobulinas anti TAP, a las proteínas que interaccionan con la proteína etiquetada (misma que se une a la columna mediante la proteína A de *S. aureus*). Posteriormente se corta la etiqueta con la proteasa y se en una segunda columna de afinidad (a calmodulina) se fija el complajo de interacción para eliminar las proteínas que no interaccionaron. La elución se realiza con un quelante del calcio de la calmodulina (EGTA o EDTA) (Figura modificada de Rigaut *et al.*, 2999).

Otra técnica *in vitro* la constituye la co-inmunoprecipitación (Lee, 2007). Consiste en inmovilizar el extracto crudo de proteínas de un organismo en una columna recubierta con el anticuerpo específico (acoplado a inmunoglobulina) para la proteína de interés. Las proteínas que no interaccionan en un complejo serán eliminadas por centrifugación en un gradiente salino: mientras que aquellas que formen un complejo podrán ser precipitadas al agregar la proteína A de *S. aureus*. Las proteínas serán separadas mediante desnaturalización por calor (Figura 13).

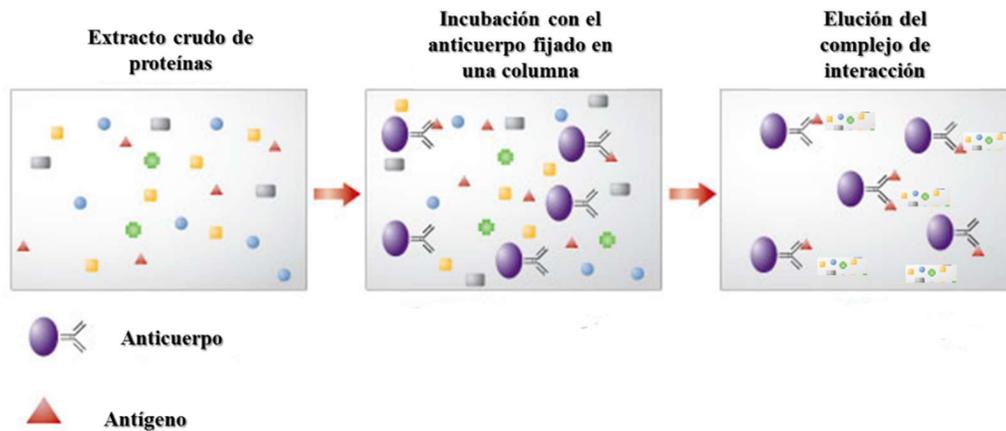


Figura 13. Técnica de co-inmunoprecipitación. La figura muestra que en la co-inmunoprecipitación el extracto crudo de proteínas de un organismo es incubado con un anticuerpo específico para la proteína de interés (antígeno) y fijado en una columna de afinidad. Las proteínas que no forman parte del complejo de interacción son descartadas, mientras que las que lo conforman son eluidas para ser analizadas (figura modificada a partir de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-methods/co-immunoprecipitation-co-ip.html>).

El sistema de doble híbrido (Figura 14) es una técnica *in vitro* que consiste en fusionar, por separado, dos proteínas de interés a dos subunidades de un factor de transcripción de un gen reportero (generalmente *lacZ*), de manera independiente una de otra. Una de las proteínas se fusiona a un dominio de unión a ADN en la región activadora UAS (por sus siglas en inglés “upstream activator sequence”); mientras que la segunda proteína se fusiona al dominio de activación (Brückner *et al.*, 2009). Si ambas proteínas fusionadas presentan una interacción, se obtendrá el transcrito del gen reportero (colonias azules para una actividad positiva de la enzima β -galactosidasa) (Wallis *et al.*, 2018). Pese a que el sistema de doble híbrido en levadura ha sido frecuentemente utilizado para confirmar interacciones proteína-proteína de manera puntual, se han obtenido mayor número de falsos positivos y falsos negativos (von Mering *et al.*, 2002).

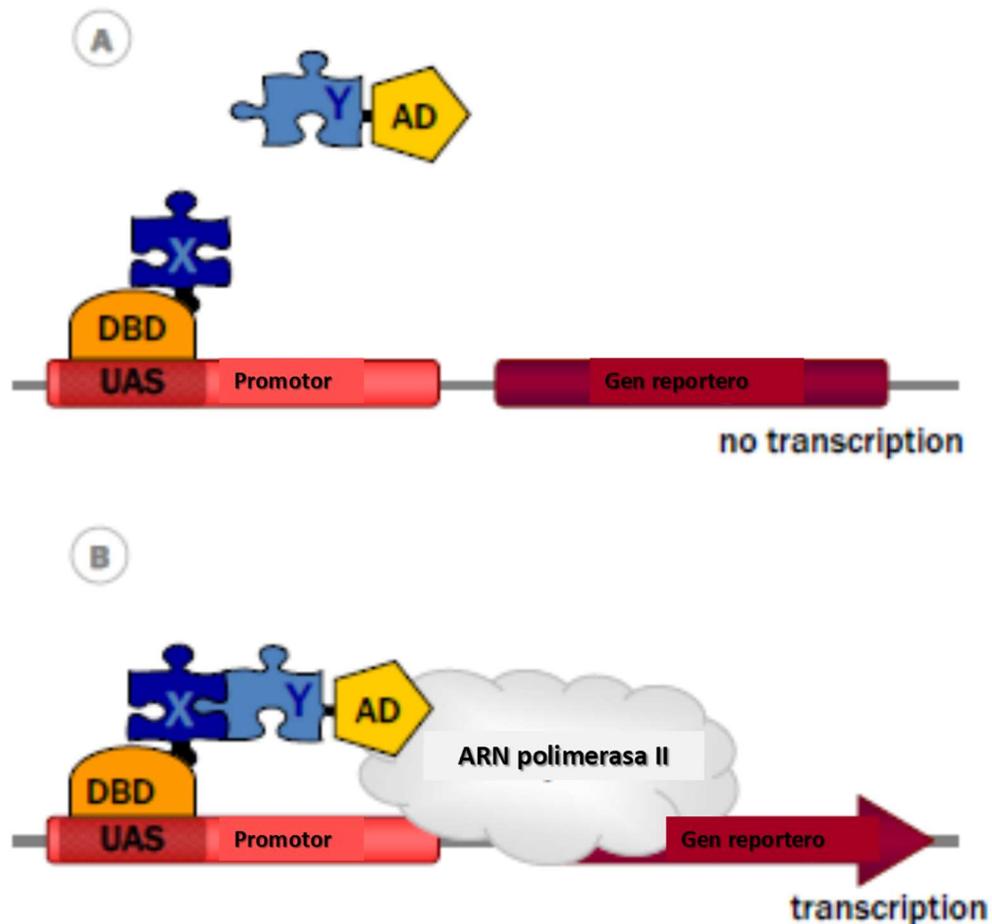


Figura 14. Sistema de doble híbrido en levadura. La figura muestra la técnica del doble híbrido en levadura en donde una proteína “X” se fusiona al dominio de unión de ADN o DBD (por sus siglas en inglés “DNA binding domain”) de un factor transcripcional de un gen reportero determinado. Mientras tanto, la proteína “Y” se fusiona al dominio activador AD (por sus siglas en inglés “activation domain”) de dicho factor transcripcional (A). Si las proteínas “X” y “Y” interactúan físicamente, se generará el transcrito del gen reportero mediante el reclutamiento de la ARN polimerasa II (B) (Figura modificada de Bückner *et al.*, 2009).

Una técnica confiable respecto a los resultados arrojados, es el “pull-down”. Ésta es una técnica *in vitro* empleada para detectar interacciones físicas entre dos o más proteínas asociadas a manera de complejo (Louche *et al.*, 2017). El método incluye una purificación

de la proteína de interés por afinidad (Figura 15). Para purificar una proteína, se pueden emplear diversos métodos. Una técnica eficaz la constituye el utilizar proteínas etiquetadas con GST (glutación-S-transferasa) o con varias histidinas continuas (normalmente 6 residuos). Respecto a la purificación por polihistidinas, la proteína recombinante debe ser previamente sobre-expresada y posteriormente inmovilizada en una matriz de resina, empleando la IMAC (por sus siglas en inglés “Immobilized metal-affinity chromatography”). Este tipo de cromatografía se basa en interacciones transitorias de un ión metálico (Ni^{+2}) con la histidina, ya que este aminoácido presenta una asociación con este tipo de elementos químicos por su estructura molecular (Figura 16). Para eluir a la proteína recombinante de la resina se emplea una solución que contenga imidazol. Este compuesto forma enlaces coordinados con el níquel de la matriz, liberando a la proteína recombinante (Bornhorst y Falke, 2000).

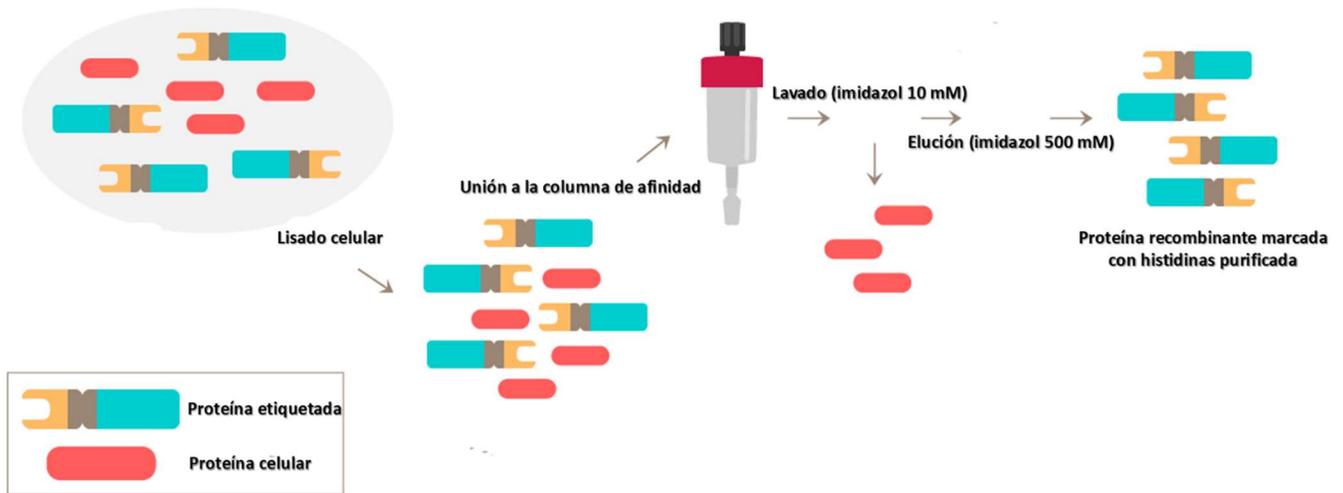


Figura 15. Purificación de una proteína recombinante etiquetada con polihistidinas mediante IMAC. La célula es lisada y su contenido se coloca en una columna que contiene la matriz de ácido nitrilotriacético recubierta con níquel. La matriz es lavada con una concentración baja de imidazol (10 mM) a fin de descartar el resto de las proteínas del lisado celular. Finalmente, la proteína recombinante etiquetada con histidinas se eluye con una solución alta en imidazol (500 mM) (Figura modificada a partir de <https://www.gelifesciences.com/en/cy/solutions/protein-research/knowledge-center/protein-purification-methods/His-tagged%20proteins>).

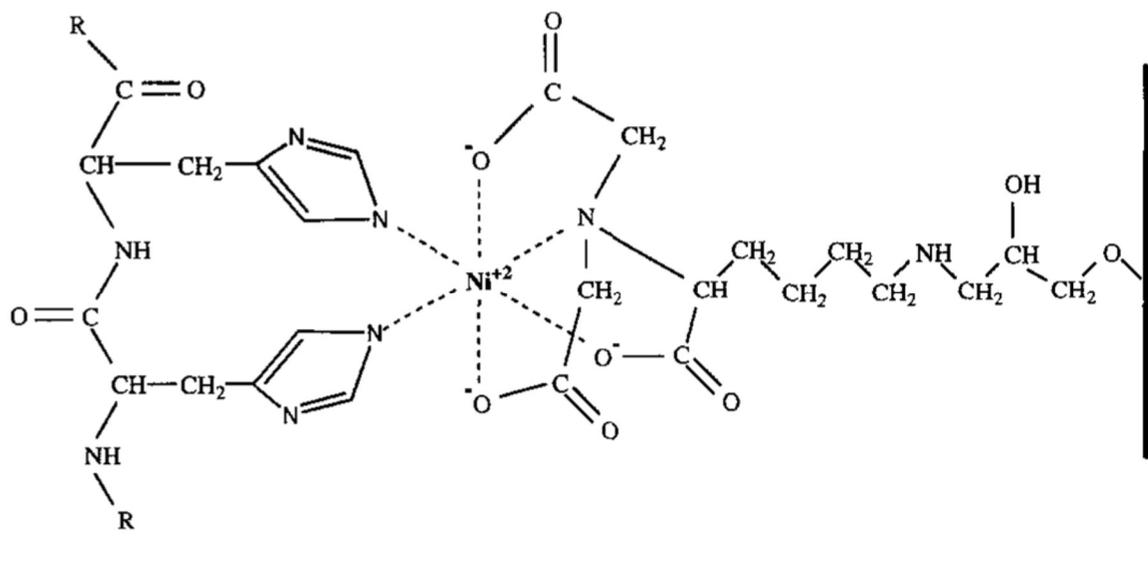


Figura 16. Unión de la histidina al níquel durante la IMAC. El níquel recubre una matriz de ácido nitrilotriacético (derecha), mientras que los anillos bencénicos de los residuos de histidina se unen a este catión bivalente (izquierda) (Figura tomada de Bornhorst y Falke, 2000).

Una vez que la proteína recombinante de interés ha sido purificada, el ensayo “pull-down” es llevado a cabo. La técnica consiste en inmovilizar la proteína recombinante etiquetada (puede ser con histidinas) en una matriz y hacer pasar las proteínas de interacción (mismas que pueden provenir de un lisado celular del organismo de interés). Posteriormente, se lava la matriz para descartar aquellas proteínas que no interaccionaron con la proteína de interés. Finalmente, se eluye el complejo de interacción, se observa empleando la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico y se identifican las proteínas de interacción mediante espectrometría de masas (Figura 17) (Louche *et al.*, 2017).

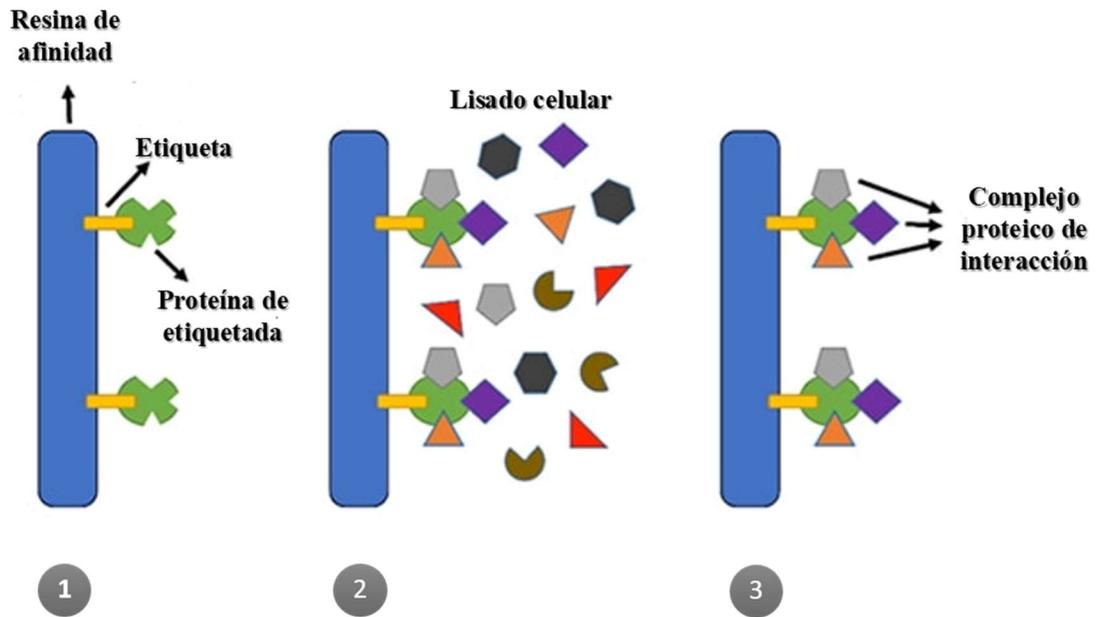


Figura 17. Técnica del ensayo “pull-down”. La proteína recombinante es inmovilizada a una resina de afinidad, gracias que contiene una etiqueta en su secuencia aminoacídica (1). El lisado celular es añadido a la resina a fin de que interaccione con la proteína recombinante (2). Las proteínas que no interaccionan con la proteína de interés se descartan, mientras que las que permanecen forman un complejo de interacción con la proteína recombinante (3) (Figura modificada a partir de <https://www.profacgen.com/pull-down-assay.htm>).

3. JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori es un agente carcinogénico con una prevalencia mundial mayor al 50%. Por su parte, MreB es una proteína bacteriana homóloga a la actina eucariota, con distintas funciones en *H. pylori* en comparación con otros procariotas. Además, se ha demostrado que esta proteína tiene efecto sobre la actividad de la ureasa (un factor de virulencia) en esta bacteria. El complejo de proteínas asociadas a MreB no ha sido estudiado a nivel experimental en *H. pylori*, por lo que la presente investigación tiene como finalidad analizar por primera vez este complejo

4. HIPÓTESIS

Las proteínas que interaccionan con MreB se encuentran en un complejo y sus interacciones están implicadas en la patogénesis de *H. pylori*.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Comprender el papel de la proteína de citoesqueleto MreB en la patogénesis de *H. pylori*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar las proteínas asociadas a MreB a partir de células de *H. pylori*.
2. Identificar las proteínas que forman el complejo de interacción con MreB
3. Confirmar las interacciones del complejo proteico de asociación con MreB

6. METODOLOGÍA

6.1 ESTABLECIMIENTO DE TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO PROTEICO DE INTERACCIÓN CON MreB

Para identificar las proteínas que interaccionan con MreB a modo de complejo, se realizó la técnica TAP (por sus siglas en inglés “tandem affinity purification”). Para tal fin, se utilizó una construcción (*pJET-CF*) obtenida mediante “PCR-sewing”, creada por la alumna de doctorado Yajuan-Fu en el laboratorio de biomedicina molecular del CBG-IPN (Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional). La construcción se efectuó en el vector *pJET* blunt 2.1 y contenía el gen *mreB* fusionado a una etiqueta TAP, seguido de un casete de resistencia a kanamicina (Figura 18).

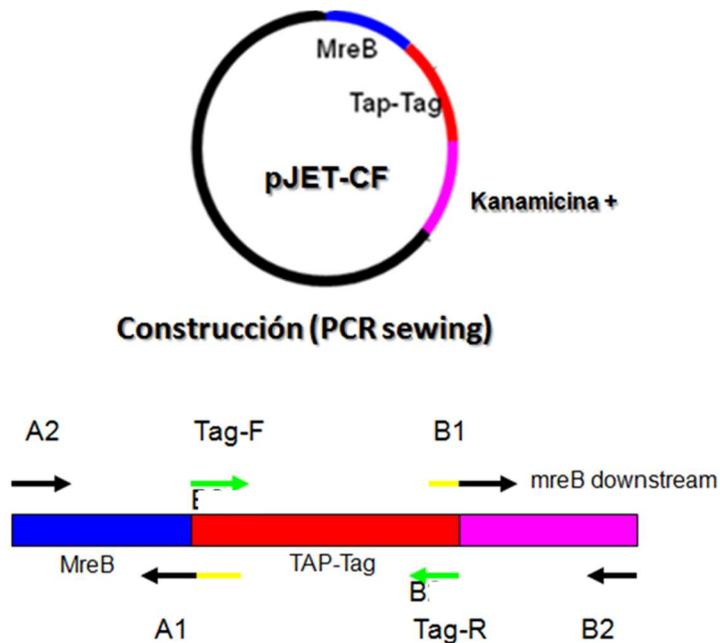


Figura 18. Construcción *pJET-CF* efectuada mediante “PCR sewing”. En esta variante de PCR se emplean iniciadores internos (A2 y A1 para *mreB* y parte de la etiqueta TAP; Tag-F y Tag-R para la etiqueta TAP y B1 y B2 para la región río abajo de *mreB*,

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

resistencia a kanamicina y parte de la etiqueta TAP) a fin de formar un solo fragmento, es decir, la construcción completa.

6.1.1 Transformación natural de *H. pylori* 26695.

La construcción *pJET-CF* fue introducida mediante transformación natural a *H. pylori* 26695, en donde el plásmido no se autoreplica, sino que se integra al genoma en el locus de *mreB*. La transformación de *H. pylori* se realizó en el Centro de Investigación Sobre enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), bajo la supervisión del Dr. Germán Rubén Aguilar Gutiérrez, en la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

Previo a la transformación natural de la bacteria con la construcción, se confirmó esta última mediante restricción, empleando una concentración final de 1 U de la enzima *EcoRI*, 1X del Amortiguador H y 121 ng/ μ L de *pJET-CF*. La reacción general de digestión utilizando una enzima de restricción empleada en este trabajo, se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Reacción general de digestión empleando una enzima de restricción.

| REACTIVOS | CONCENTRACIÓN FINAL |
|----------------------|---------------------|
| Agua desionizada | Variable |
| Amortiguador 10X | 1 X |
| ADN | Variable |
| Enzima 10 U/ μ L | 1 U |
| VOLUMEN FINAL | 10 μ L |

Posterior a la confirmación de la construcción, se llevó a cabo la transformación natural de la bacteria, por lo que se cultivó a *H. pylori* 26695 por 2 días en una incubadora marca Thermo Scientific®, a 37 °C en condiciones microaerofílicas (10% de CO₂) en agar soya tripticaseína suplementado con 5% de sangre de carnero (agar sangre) y suplemento selectivo para *H. pylori* marca Oxoid (vancomicina 5 mg, trimetoprim 2.5 mg, cefsulodina 2.5 mg y anfotericina B 2.5 mg). Este cultivo fue empleado para sembrar posteriormente, parches aislados de aproximadamente 1.5 cm de diámetro en agar sangre sin suplemento selectivo para *H. pylori*, a razón de 2 parches por caja de Petri. Se realizaron 8 parches (8 transformaciones), los cuales se incubaron por 3-6 horas, a 37°C con 10% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se añadió a cada parche 2 μ g de *pJET-CF* (cuantificado en un Nanodrop marca Thermo Scientific®), mezclando con el asa bacteriológica. Los parches se incubaron de 18-24 horas. Transcurrido este lapso de tiempo, cada parche fue tomado

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

en su totalidad con el asa bacteriológica y fue resuspendido en 200-300 µL de PBS 1X pH 7.4. El cultivo resuspendido fue sembrado en agar sangre con kanamicina (25 µg/mL) e incubado por 3-5 días. Cabe mencionar que, para determinar si existía crecimiento bacteriano en cada resiembra, se realizó la tinción Gram (Beveridge, 2001).

6.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE INTERACCIÓN CON MreB MEDIANTE ENSAYO “PULL-DOWN”

6.2.1 Construcciones Genéticas

La transformación natural de *H. pylori* con *pJET-CF* resultó letal para la bacteria, por lo que se diseñó una nueva estrategia para identificar el complejo de interacción con MreB. La estrategia consistió en realizar diversas construcciones genéticas que permitieran el establecimiento de un ensayo “pull-down” en *H. pylori* 26695 (Figura 19).

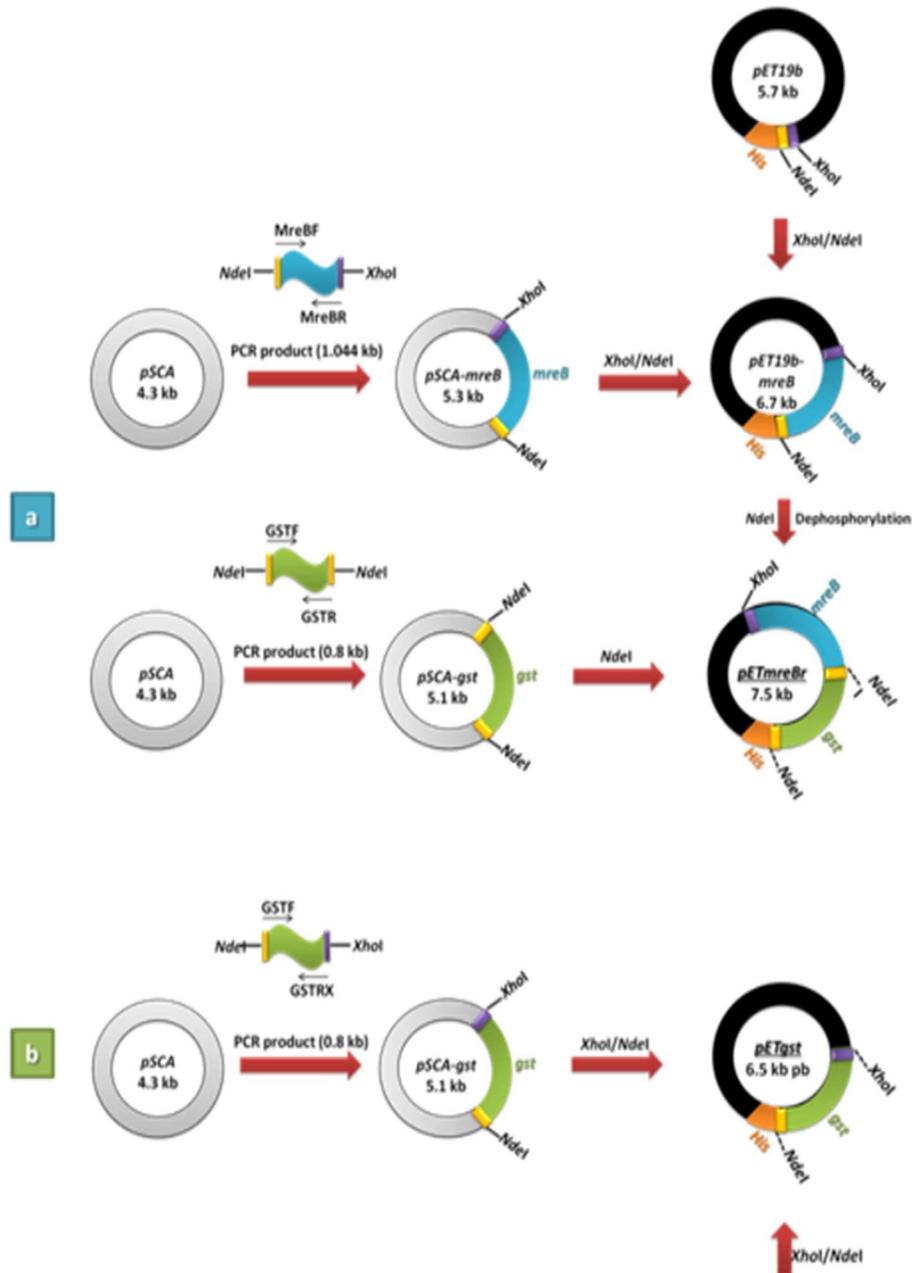


Figura 19. Construcciones genéticas efectuadas para el establecimiento del ensayo “pull-down” en *Helicobacter pylori* 26695. El gen *mreB* se amplificó mediante los iniciadores MreBR-MreBF y se insertó en el vector de clonación *pSCA* de StrataClone®, formando la construcción *pSCA-mreB*. Posteriormente, se subclonó en el vector de expresión *pET19b*, utilizando las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. La construcción fue denominada *pETmreB*. Posteriormente, se le agregó la etiqueta GST a *pETmreB*. Para ello

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

se amplificó *gst* con los iniciadores GSTF-GSTR. Acto seguido se clonó en el vector *pSCA* de StrataClone® (*pSCA-gst*). Finalmente, se empleó *NdeI* para subclonar a *gst* en *pETmreB* desfosforilado, dando paso a la formación de *pETmreBr* (a). Por otra parte, se subclonó a *gst* en *pET19b*, originando la construcción *pETgst*, que servirá como testigo en el ensayo “pull-down” (b).

6.2.2 Clonación de *mreB* en *pET19b*

A fin de realizar el ensayo “pull-down”, se procedió a la clonación de *mreB* en el vector de expresión *pET19b*. Este vector posee como característica importante, el contener una etiqueta de 10 histidinas, útil para purificación de proteínas y ensayos “pull-down”; además de poseer la región codificante *lac* para identificar colonias transformantes (Figura 54 en Anexos).

Para la amplificación de *mreB* (1044 pb) se diseñaron los iniciadores denominados MreBF (sentido) y MreBR (antisentido) (Cuadro 10 en Anexos), usando el programa Primer Select de DNA Star Lasergene 15.2. Cabe mencionar que tanto MreBF como MreBR contenían sitios de restricción para las endonucleasas *NdeI* y *XhoI*, respectivamente. La reacción de PCR fue efectuada partiendo de ADN genómico de *H. pylori* 26695 con una concentración inicial de 44 ng/μL. Y se llevó a cabo en un termociclador marca Bio-Rad® modelo DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler. La reacción general de PCR utilizada en este trabajo es mostrada en el cuadro 3. Para la amplificación de *mreB* se empleó una T_m de 50 °C y 1.5 minutos de extensión a 72 °C. Las condiciones generales de amplificación se muestran en el cuadro 4. El producto de PCR se corrió en agarosa al 0.7%, a 77 voltios, empleando como amortiguador de carga Green GoTaq® con SYBER Green, a razón de 1 μL por cada 3 μL de producto de PCR obtenido. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador de 1 kb de Promega® con número de catálogo G6941. El termociclador y las condiciones de corrimiento de los

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

geles de agarosa, fueron las mismas para todas las reacciones de PCR empleadas en este trabajo.

Cuadro 3. Reacción general de PCR para la obtención de amplicones.

| REACTIVO | CONCENTRACIÓN FINAL |
|--------------------------------------|---------------------|
| Amortiguador sin magnesio 10X | 1 X |
| MgCl₂ 50 mM | 1.2 mM |
| dNTP's 10 mM | 0.2 mM |
| Iniciador sentido 25 µM | 5 µM |
| Iniciador antisentido 25 µM | 5 µM |
| ADN | 2.64 ng/µL |
| Agua miliQ estéril | Variable |
| GoTaq® ADN polimerasa | 1.25 U |
| VOLUMEN FINAL | 25 µL |

Cuadro 4. Condiciones generales de amplificación en la obtención de productos de PCR.

| Temperatura (°C) | Tiempo (minutos) |
|--------------------|--|
| 100 | Constante en la tapa del termociclador |
| 95 | 2 |
| 95 | 0.5 |
| Tm variable | 0.5 |
| 72 | Variable |
| *30 ciclos* | |
| 72 | 10 |
| 4 | Ilimitado |

El gen *mreB* amplificado fue clonado en el vector *pSCA* de StrataClone® (Figura 55 en Anexos), siguiendo las especificaciones del estuche comercial StrataClone® PCR cloning con número de catálogo 240205. La construcción generada se denominó *pSCA-mreB*. Para el escrutinio, se realizó PCR en colonia del gen en cuestión. La técnica radica en resuspender cada colonia en 5 µL de agua miliQ estéril e incubarla a 99 °C por 20 minutos, para posteriormente centrifugar a 14,000 rpm y tomar 2 µL de ADN como templado para efectuar la reacción (cuyas condiciones fueron descritas anteriormente). Una vez confirmado el inserto en las colonias bacterianas de *E. coli*, propias del estuche comercial StrataClone®, se cultivó cada colonia transformante en 5 ml de medio Luria Bertani (LB) suplementado con ampicilina (100 µg/mL), a fin de realizar la extracción

plasmídica según las especificaciones del estuche comercial Qiaprep spin Miniprep de Qiagen® con número de catálogo 27106. Después de realizada la extracción del plasmídica, se confirmó la clonación por secuenciación automatizada, empleando los iniciadores universales M13 sentido y M13 antisentido. Se empleó el secuenciador Applied Biosystem (ABI) de 4 capilares modelo 3130. Las secuencias fueron visualizados en el programa Chromas Lite. Las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando el estuche comercial BigDye® Terminador. Para este procedimiento, se realizaron reacciones de PCR utilizando 4 µL de amortiguador BigDye 5X, 4 µL de BigDye, 1 µL de uno de los iniciadores, 1 µL del producto de PCR como templado y 10 µL de agua miliQ estéril. Se llevaron a cabo 2 de estas reacciones, añadiendo el iniciador sentido y el antisentido por separado. Cada reacción de PCR realizada se efectuó en el agitador térmico marca Eppendorf® modelo 4850, utilizando el programa Sec 3130 (1: 96°C por 1 minuto; 2: 96°C por 10 segundos; 3: 50°C por 5 segundos; 4: 62°C por 4 minutos; 5: 25 ciclos a partir del paso 2; 6: 62°C por 1 minuto; 7: 4°C por tiempo ilimitado). Posteriormente, se tomaron 10 µL de la reacción de PCR y se mezclaron con 10 µL de Xterminador y 45 µL de amortiguador SAM (S-adenosilmetionina). La reacción fue mezclada por 10 segundos. La mezcla anterior se incubó a 25 °C por 30 minutos en el agitador térmico. Cada 5 minutos, las muestras fueron mezcladas nuevamente. Posteriormente se centrifugaron por 2 minutos a 14,000 rpm. Se tomaron 30 µL del sobrenadante, mismo que fue empleado para la secuenciación.

La secuencia nucleotídica obtenida se utilizó para realizar un análisis de tipo BLAST en el NCBI. Posteriormente, fue alineada con la secuencia de *mreB* de *H. pylori* 26695 del, empleando el programa Clustal W 2.1, a fin de verificar que dicha secuencia no presentara cambio nucleotídico alguno. La secuencia se tradujo a su respectiva cadena de aminoácidos, empleando el programa EMBOSS Transeq y fue también alineada con la secuencia original de MreB.

Una vez confirmado el gen por secuenciación, se subclonó en *pET19b* (*pETmreB*). Previo a la subclonación se digirieron, por separado, 50 ng/µL de volumen final del vector y del inserto. La concentración inicial de *mreB* fue de 150 ng/µL, mientras que la de

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

pET19b fue de 170 ng/μL. La digestión se llevó a cabo empleando las enzimas *NdeI* y *XhoI*, así como el amortiguador D. La reacción general de digestión empleando 2 enzimas de restricción de forma simultánea, es mostrada en el cuadro 5. Posterior a la digestión, se purificaron vector e inserto a partir de gel de agarosa al 0.7%, usando el estuche comercial QiAquick Gel Extraction de Qiagen® con número de catálogo 28704. Para finalizar la construcción, se procedió a la ligación de *mreB* en *pET19b*. La concentración inicial del inserto fue de 20 ng/μL, mientras que la del vector fue de 100 ng/μL. La reacción general de ligación empleada en este trabajo, se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 5. Reacción de digestión empleando dos enzimas de restricción.

| REACTIVOS | CONCENTRACIÓN FINAL |
|------------------|---------------------|
| Agua desionizada | Variable |
| Amortiguador 10X | 1 X |
| ADN | 50 ng/μL |
| Enzima1 10 U | 1 U |
| Enzima2 10 U | 1U |
| VOLUMEN FINAL | 70 μL |

Esta se llevó a cabo a 37 °C durante 4 horas.

Cuadro 6. Reacción general de ligación empleada en la generación de construcciones genéticas.

| REACTIVO | CONCENTRACIÓN FINAL |
|----------------------------|-----------------------------|
| Agua desionizada | Variable |
| Amortiguador T4 10X | 1X |
| Vector | 10 ng/ μ L |
| Inserto | 2 ng/ μ L |
| Ligasa T4 500 U | 5 U |
| Volumen final | 10 μL |

* La reacción se incubó por 17 horas a 4 °C.

El producto resultante de la ligación se replicó en *E. coli DH5 α* . Para tal efecto, la transformación con esta construcción se llevó a cabo añadiendo la reacción de ligación a 100 μ L de células *E. coli DH5 α* competentes descongeladas en hielo. La mezcla se incubó en hielo por 20 min. Posteriormente, se les dio un choque térmico a las células, colocándolas a 42 °C en el agitador térmico marca Eppendorf® modelo 4850, por un periodo de 50 segundos e inmediatamente después, las células se colocaron en hielo por 2 minutos. Se añadió a las células 0.5 mL de medio LB, permitiendo la recuperación de las mismas por 1 hora y media a 37 °C en agitación constante (300 rpm). Las células fueron plaqueadas en agar LB suplementado ampicilina (100 μ g/mL). Para confirmar las colonias transformantes obtenidas se realizó PCR en colonia del gen *mreB*, cuyas condiciones de reacción fueron mencionadas con anterioridad.

La construcción obtenida fue verificada tanto por digestión usando las enzimas *NdeI* y *XhoI*, como por PCR de *mreB* a partir de plásmido extraído. La extracción plasmídica fue realizada según las especificaciones del estuche comercial Qiaprep spin Miniprep kit de Qiagen® con número de catálogo 27106. Una tercera forma de confirmación de la construcción fue mediante secuenciación automatizada. La secuenciación de la construcción se llevó a cabo empleando los iniciadores universales T7 sentido y T7 antisentido (Cuadro 10 en Anexos), propios del vector *pET19b*, utilizando el protocolo de secuenciación antes descrito.

6.2.3 Adición de la etiqueta GST a *pET19b-mreB*

Se decidió fusionar la etiqueta GST a *pETmreB*, a fin de obtener una segunda opción tanto de purificación de la proteína recombinante como de ensayo “pul-down”. Ya que ambos procesos pueden ser efectuados inmovilizando a la proteína en una resina mediante histidinas, o bien, mediante la etiqueta GST. Para fusionar la GST a *mreB*, se amplificó el gen *gst* a partir del vector de baculovirus *pAcghLT-B*. Para ello, se diseñaron los iniciadores específicos para *gst* denominados GSTF (sentido) y GSTR (antisentido) (Cuadro 10 en Anexos) en el programa Primer Select de DNASTar Lasergene 15.2. Cada iniciador contenía el sitio de corte para la enzima de restricción *NdeI*. Así mismo, el iniciador GSTR contenía el sitio de corte para trombina (ACTACCGCGTGGCACCAG), previendo la necesidad de llegar a retirar la proteína para que la misma fuese analizada por cristalografía en una investigación a futuro. Para la amplificación de *gst* a partir de *pAcghLT-B*, se empleó la reacción general de PCR (Cuadro 3). La concentración inicial del vector fue de 88 ng/μL. Las condiciones de amplificación (Cuadro 4) variaron al utilizar una T_m de 58 °C y 40 segundos de extensión a 72 °C.

El producto de amplificación obtenido (897 pb), fue clonado en el vector *pSCA* de StrataClone®. La construcción fue denominada *pSCA-gst*. La transformación se confirmó mediante PCR en colonia utilizando los iniciadores GSTF-GSTR, mientras que la construcción obtenida fue verificada tanto por digestión con la enzima *NdeI* como por secuenciación automatizada. La secuenciación de la construcción se llevó a cabo empleando los iniciadores universales M13 sentido y M13 antisentido, propios del vector, empleando el método antes descrito. La secuencia nucleotídica obtenida fue alineada con la secuencia original de *gst* del vector *pAcghTL-B*, empleando el programa Clustal W 2.1, a fin de verificar que dicha secuencia no presentara cambio alguno.

Para fusionar a *gst* con *mreB*, se digirió por separado, tanto a *pSCA-gst* (a una concentración inicial de 100 ng/μL), como a *pETmreB* (a una concentración inicial de 180 ng/μL). Para tal fin y partiendo de la reacción general de digestión (Cuadro 2), se empleó la enzima *NdeI* y el amortiguador D. La construcción *pETmreB* se desfosforiló en uno de los extremos, a fin de evitar que se religara. Para la desfosforilación de la construcción se siguieron las especificaciones del estuche comercial CIAP (por sus siglas en inglés Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) de Promega® con número de catálogo M2825. Posteriormente, ambos, inserto y vector, fueron purificados a partir de gel de agarosa al 0.7% usando el estuche comercial QiAquick Gel Extraction de Qiagen® con número de catálogo 28704.

Posteriormente, se realizó la reacción de ligación entre *pETmreB* y *gst*, dando lugar a la construcción *pETMreBr*. Partiendo de la reacción general de ligación (Cuadro 6), se empleó una concentración inicial de 152 ng/μL para el vector desfosforilado y de 30 ng/μL para el inserto. La transformación de esta construcción se llevó a cabo en células de *E. coli DH5α* mediante choque térmico. La transformación se confirmó mediante PCR en colonia utilizando tanto los iniciadores GSTF-GSTR como los iniciadores T7F-T7R (variando la Tm a 50 °C y el tiempo de extensión a 1 minuto con 50 segundos). Mientras la construcción era obtenida fue verificada tanto por digestión con la enzima *NdeI* como por secuenciación automatizada. La secuenciación de la construcción se llevó a cabo empleando los iniciadores universales T7 sentido y M13 antisentido, propios del vector,

empleando el método antes descrito. La secuencia nucleotídica obtenida fue alineada con la secuencia original de *gst* del vector *pAcghLT-B*, empleando el programa Clustal W 2.1, a fin de verificar que dicha secuencia no presentara cambio alguno. Cabe destacar que, la orientación correcta del vector fue confirmada mediante PCR. Para ello, en la reacción de se utilizaron en conjunto los iniciadores GST sentido (GSTF) y MreB antisentido (MreBR). La T_m empleada en la verificación fue de 50 °C y el tiempo de extensión fue de 1.5 minutos a 72 °C.

6.2.4 Clonación de *gst* en *pET19b*

Para llevar a cabo el ensayo “pull-down”, era necesario contar con una construcción testigo. Por tanto, se efectuó la clonación de *gst* en *pET19b*. Para tal fin, se partió de la construcción *pSCA-gst* para digerir tanto a *gst* como a *pET19b* con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. Tomando en cuenta la reacción general de digestión utilizando enzimas de restricción (Cuadro 5), se empleó una concentración inicial de 130 ng/μL del inserto y 170 ng/μL del vector. El buffer empleado fue el D. Posteriormente, se purificaron ambos, *gst* y *pET19b* digeridos, a partir de gel de agarosa al 0.7% usando el estuche comercial QiAquick Gel Extraction de Qiagen® con número de catálogo 28704. Una vez realizada la digestión y purificación, se realizó la reacción de ligación entre vector e inserto a fin de formar la construcción testigo *pETgst*. En función de la reacción general de ligación (Cuadro 6), se partió de una concentración inicial de 100 ng/μL para *pET19b* y de 18 ng/μL para *gst*.

La transformación se confirmó mediante PCR en colonia, empleando los iniciadores T7F’T7R y GSTF’GSTR. La construcción se verificó tanto por restricción con *NdeI* y *XhoI*, como por secuenciación automatizada. La secuencia nucleotídica obtenida fue alineada con la secuencia original de *gst* del vector *pAcghTL-B*, empleando el programa Clustal W 2.1, a fin de verificar que no presentara cambio alguno.

6.2.5 Sobre-expresión de MreB y GST recombinantes

Previo al ensayo “pull-down”, se sobre-expresaron en *E. coli* las proteínas recombinantes MreB (His-GST-MreB) y GST (His-GST) codificadas en *pETmreBr* y en *pETgst*, respectivamente. Antes de realizar este procedimiento, se empleó el programa Rare Codon Calculator (RaCC) del NIH (National Institute of Health), para calcular el número de codones de uso diferentes en la expresión de MreB de *H. pylori* 26695 y decidir la posible cepa para la expresión heteróloga.

Los resultados obtenidos en el RaCC arrojaron un número considerable de codones considerados como “raros” en MreB de *H. pylori* 26695. Por tal motivo, se decidió utilizar como candidatas de sobre-expresión a las cepas *BL21(DE3)*, *Rosetta gami* y *Codon Plus* de *E. coli*. En el cuadro 11 en anexos, se muestra el uso y condiciones de cultivo de cada cepa empleada en este trabajo.

La sobre-expresión de MreB y GST recombinante se llevó a cabo en *E. coli Codon Plus* utilizando como inductor de la expresión al isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) en concentración. Para la sobre-expresión, se picó una colonia transformante con *pETmreBr*, o bien con *pETgst*, y se cultivó en medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL) y cloramfenicol (34 μ g/mL), a 37°C por 18 hr (precultivo). Transcurrido este tiempo, se inocularon 3 mL de precultivo por cada 50 mL de LB suplementado con ampicilina/cloranfenicol. Para la sobre-expresión de MreB recombinante, las células fueron cultivadas hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 0.6 a 600 nm de longitud de onda, a 37°C en agitación constante (200 rpm). En el caso de la sobre-expresión de GST recombinante, la densidad óptica fue de 1.2. Posteriormente, se tomó 1 mL como tiempo cero (T0). El T0 se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el sedimento

se guardó a 4°C. El resto del cultivo fue inducido con 1 mM de IPTG a 37 °C durante 4 horas para MreB recombinante y 2 horas para GST recombinante. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL del cultivo inducido (T4), que se procesó de la misma forma que el T0. Los sedimentos celulares de T0 y T4 se resuspendieron en amortiguador de carga 6X (por cada 10 mL se agregan 3.75 ml de Tris 1M pH 6.8, 1.2 g de SDS, 6 mL de glicerol al 100%, 0.006 g de azul de bromofenol y 0.462 g de DTT) y se centrifugaron a 14,000 rpm por 7 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron 10 µL del sobrenadante por muestra, para cargarlos en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10%, a fin de observar la sobre-expresión de las proteínas recombinantes. El marcador de peso molecular pre-teñido usado en los geles obtenidos fue de la marca Biolabs® con número de catálogo P7709S.

Para identificar si las proteínas recombinantes se encontraban en la fracción soluble o insoluble de la célula, se siguieron dos protocolos distintos. Para la parte insoluble, en donde la proteína forma cuerpos de inclusión, se le solubilizó con urea resuspendiendo cada sedimento proveniente de un cultivo de 150 mL inducido con IPTG, en 7.5 mL de amortiguador de resuspensión (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, KCl 150 mM y PMSF 0.1 mM añadido al momento). El sedimento resuspendido se sonicó 12 ciclos al 50%. Cada ciclo tuvo una duración de 10 segundos. Se mantuvieron intervalos de 20 segundos sin sonicación entre cada ciclo. Posteriormente se añadió 1 mM de MgSO₄ y 0.1 mg/mL de lisozima Sigma-Aldrich® con número de catálogo L7651. Se incubó en agitación constante (300 rpm) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Así mismo, se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El sedimento formado fue resuspendido en amortiguador de lavado 1 (1% de Tritón X-100, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM y PMSF 0.1 mM añadido al momento) y se sonicó nuevamente, agregando MgSO₄ y lisozima para continuar lisando las células. Acto seguido, se incubaron las células en agitación constante (300 rpm) durante 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante. El sedimento obtenido se resuspendió en 7.5 mL de

amortiguador de lavado 2 (1% de Tritón X-100, Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y PMSF 0.1 mM agregado al momento), se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El sedimento formado fue resuspendido en 7.5 mL de amortiguador de lavado 3 (agua desionizada y PMSF 0.1 mM agregado al momento). Además, se centrifugó el resuspendido a 12,000 rpm por 30 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El sedimento generado fue resuspendido en 7.5 mL de solución de urea (urea 8 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y PMSF 0.1 mM agregado al momento). El resuspendido se incubó en agitación constante (300 rpm) por 4 horas a temperatura ambiente, agregando de nuevo PMSF 0.1 mM transcurridas las 2 primeras horas de incubación. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 30 minutos a 4 °C, se separó el sedimento del sobrenadante y se reservó éste último. El sobrenadante fue visualizado en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10%.

Para obtener a las proteínas de la parte soluble de la célula, se resuspendió cada sedimento proveniente de un cultivo de 150 mL inducido con IPTG, en 4.5 mL de amortiguador de lisis pH 7.5 (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, 20% de glicerol, EDTA 10 mM, DTT 1 mM y agua desionizada). El sedimento resuspendido se sonicó 12 ciclos al 50%. Cada ciclo tuvo una duración de 10 segundos. Se mantuvieron intervalos de 20 segundos sin sonicación entre cada ciclo. Posteriormente se centrifugó el resuspendido durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento obtenido se separó del sobrenadante y este último fue visualizado en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 10%.

6.2.6 Purificación de MreB y GST recombinantes

Para el “pull-down” se requería purificar las proteínas recombinantes previamente sobre-expresadas. La purificación de MreB y GST recombinantes, así como el análisis de plegamiento y estructuración de las proteínas y el ensayo “pull-down”, se efectuaron en el laboratorio de investigación bioquímica de la ENMH (Escuela

Nacional de Medicina y Homeopatía) del IPN en la ciudad de México, bajo la supervisión de la Doctora Claudia Guadalupe Benítez Cardoza.

El protocolo de purificación consistió en sobre-expresar previamente las proteínas recombinantes empleando 1 L de cultivo inducido con IPTG para cada fracción obtenida. De este modo, se emplearon 2 L de cultivo para la fracción soluble e insoluble de MreB recombinante, respectivamente; y 1 L de cultivo para la fracción soluble de GST recombinante, siendo que esta proteína no refirió sobre-expresión en la fracción insoluble. El protocolo de inducción de la sobre-expresión, aunado al de la obtención de las fracciones solubles e insolubles de las proteínas, fue detallado en el apartado anterior.

Una vez obtenidas ambas fracciones de las proteínas recombinantes, éstas fueron purificadas empleando las columnas His-Trap de 1 mL de General Electric®, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Cabe mencionar que para la elución de las proteínas purificadas, se empleó una solución de imidazol 500 mM (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 Mm e imidazol 500 mM); mientras que para el lavado de las proteínas, la concentración del compuesto fue de 10 mM. Para la unión de las proteínas a la columna, se prescindió del imidazol. Inmediatamente después de la purificación, las proteínas fueron concentradas en columnas Amicon® a fin de reducir el solvente aproximadamente 4 veces su volumen. Los resultados de la purificación fueron visualizados en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10%.

6.2.7 Análisis del plegamiento y estructuración de la fracción soluble e insoluble de las proteínas recombinantes

Una vez purificadas las fracción soluble e insoluble de MreB recombinante y la soluble de GST recombinante, se procedió a determinar si las fracciones contenían un

plegamiento y estructuración adecuados para ser empleados en el ensayo “pull-down”. Para tal fin, se procedió a la diálisis de las fracciones de las proteínas purificadas durante 18 horas, empleando membranas acetato de celulosa de 29 mm de diámetro con poros de 0.01 μm SpectraPor®. La solución de diálisis empleada fue el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8.0 (K_2HPO_4 25 mM y KH_2PO_4 25mM).

Una vez purificadas y dializadas ambas fracciones de las proteínas recombinantes, fueron sometidas a un análisis de fluorescencia para determinar si su plegamiento era el correcto. Para ello, se empleó un espectrofluorómetro Perkin Elmer® LS55, en donde también se efectuó la cuantificación proteica a 280 nm de longitud de onda. La estructuración de las proteínas se realizó mediante dicroísmo circular en un espectropolarímetro JAS.CO® J-815. Los resultados obtenidos fueron analizados en el programa Origin 8.0. El programa en línea Dichroweb fue empleado para obtener en porcentaje, la composición de la estructura secundaria de las proteínas recombinantes. El resultado se comparó con la estructura secundaria de las proteínas que se predijo en el programa Phyre 2.

6.2.8 Ensayo “pull-down” e identificación de las proteínas de interacción con MreB de *H. pylori* 26695 mediante espectrometría de masas

Para determinar las el interactoma de MreB en *H. pylori* 26695, se llevó a cabo por triplicado el ensayo “pull-down”, empleando MreB recombinante como proteína experimental y a GST recombinante como testigo. El protocolo fue llevado a cabo de acuerdo a lo reportado anteriormente por Ranjan *et al.*, 2013 y se partió de células de *H. pylori* 26695 (1×10^{10}) donadas por la Dra. Yolanda López Vidal, titular del laboratorio de inmunología microbiana de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las células se centrifugaron a 14,000 rpm a 4 °C y se descartó el PBS 1X en el que originalmente se encontraban resuspendidas. El sedimento celular generado fue resuspendido en 1.5 mL de amortiguador de lisis

(NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM, 1% de tween 20 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PMSF). Posteriormente, se lisaron las células mediante sonicación al 50% con 12 ciclos. Cada ciclo tuvo una duración de 10 segundos. Se mantuvieron intervalos de 20 segundos sin sonicación entre cada ciclo. Las células se centrifugaron a 14,000 rpm a 4 °C y se reservó el sobrenadante. Después se colocó a las mismas en un microtubo Eppendorf® junto con 50 μL de microesferas recubiertas con níquel de la marca Genescript®, 10 μg de la fracción soluble de GST recombinante y el lisado celular obtenido en el paso anterior. La mezcla fue incubada en hielo por 2 horas, a fin de evitar que aquellas proteínas que interaccionaran con GST recombinante, lo hicieran con las microesferas. A este proceso se le conoce como pre-limpieza. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las proteínas que interaccionaron con GST recombinante fueron eliminadas mediante centrifugación (14,000 rpm durante 1 minuto a 4 °C). Se separaron las microesferas del sobrenadante y este último se distribuyó de forma equitativa en 2 microtubos. Al primer tubo se le agregaron 50 μL de microesferas y 10 μL de MreB recombinante. Al segundo tubo se le agregó la misma cantidad de microesferas, además de 10 μL de GST recombinante (testigo). Ambos microtubos se incubaron en hielo durante 2 horas para permitir que el complejo proteico de interacción se uniera a las microesferas mediante la etiqueta de histidinas. Los microtubos fueron centrifugados a 14,000 rpm a 4 °C durante 1 minuto. Las microesferas se separaron del sobrenadante y se le agregó 1.5 mL de amortiguador de lavado (NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 100 mM e imidazol 20 mM). Posteriormente las microesferas se centrifugaron a 14,000 rpm a 4 °C durante 1 minuto. Se separó el sobrenadante de las microesferas y se les agregó el amortiguador de elución (NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 100 mM e imidazol 500 mM) a fin de separar el complejo de interacción de las mismas. Las proteínas eluidas fueron observadas en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10%. A partir del gel de poliacrilamida, las bandas de proteínas resultantes fueron cortadas e identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF-MS (por sus siglas en inglés “*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*”). Este servicio fue efectuado por la M. en C. Alicia López Chagolla, encargada del

Laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN, en la ciudad de Irapuato, Guanajuato, México.

6.3 CONFIRMACIÓN DE LAS INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO CON MreB MEDIANTE MÉTODOS EXPERIMENTALES

Una vez identificadas las proteínas del complejo de interacción con MreB recombinante, se confirmaron dichas interacciones usando la técnica de doble híbrido en bacteria. De esta manera, se diseñaron 27 pares de iniciadores para amplificar a partir de ADN genómico de *H. pylori* 26695 (con una concentración inicial de 44 ng/ μ L) los genes codificantes para algunas proteínas del complejo, incluyendo MreB y MreC. Los iniciadores contenían sitios de restricción para diversas enzimas y se detallan en el cuadro 10 en Anexos. La reacción general de PCR (Cuadro 3) fue tomada como base para amplificar cada gen. Basándose en las condiciones generales de amplificación (Cuadro 4), las variaciones a las mismas se muestran en el cuadro 12 en anexos. Cabe mencionar que la elección de las proteínas para confirmar interacción con MreB, fue aleatoria, excepto para aquellas que se ven envueltas en la patogénesis de la bacteria.

Una vez amplificados los 27 genes, se emplearon para la realización del doble híbrido en bacteria, para lo que se hizo uso del estuche comercial BACTH System (Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System) de Euromedex® con número de catálogo EUK001. En el protocolo (Figura 20) se clonaron los genes codificantes para las proteínas del complejo, en el vector *pSCA* de Strataclone® y se confirmó la clonación mediante PCR en colonia. Posteriormente se subclonaron dichos genes usando las enzimas de restricción adecuadas. El gen *mreB* se insertó tanto en el vector *pKT25* como el *pUT18C*. Los genes del complejo únicamente fueron insertados en el vector *pUT18C*. Así, se generaron las construcciones *pKT25-mreB* y *pUT18C-X*. Las células *E. coli XL1-blue* fueron transformadas con las construcciones obtenidas. La clonación fue verificada mediante PCR en colonia. Acto seguido, se purificaron las construcciones *pKT25-mreB* y *pUT18C-X* a partir de *E. coli XL1-blue* utilizando el estuche comercial de Qiaprep spin Miniprep de Qiagen®. Ambas construcciones obtenidas se emplearon para co-transformar a la cepa *E. coli BTH101* y llevar a cabo el ensayo de interacción proteína-proteína en agar LB suplementado con IPTG (0.5 mM), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) (40 µg/mL), ampicilina (100 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL). Las células se cultivaron de 18 a 72 horas a 30 °C y a 37 °C. Posteriormente, a las colonias con interacción positiva (color azul) se les resembró en estriado en el medio de cultivo descrito anteriormente y se determinó la actividad de la enzima β-galactosidasa. Cabe mencionar que, este ensayo se realizó por triplicado, usando como testigo positivo la co-transformación de la cepa con los vectores *pKT25zip* y *pUT18C* y como testigo negativo *pKT25zip* y cada *pUT18C-X*, o bien con *pUT18Czip* y *pKT25-mreB*.

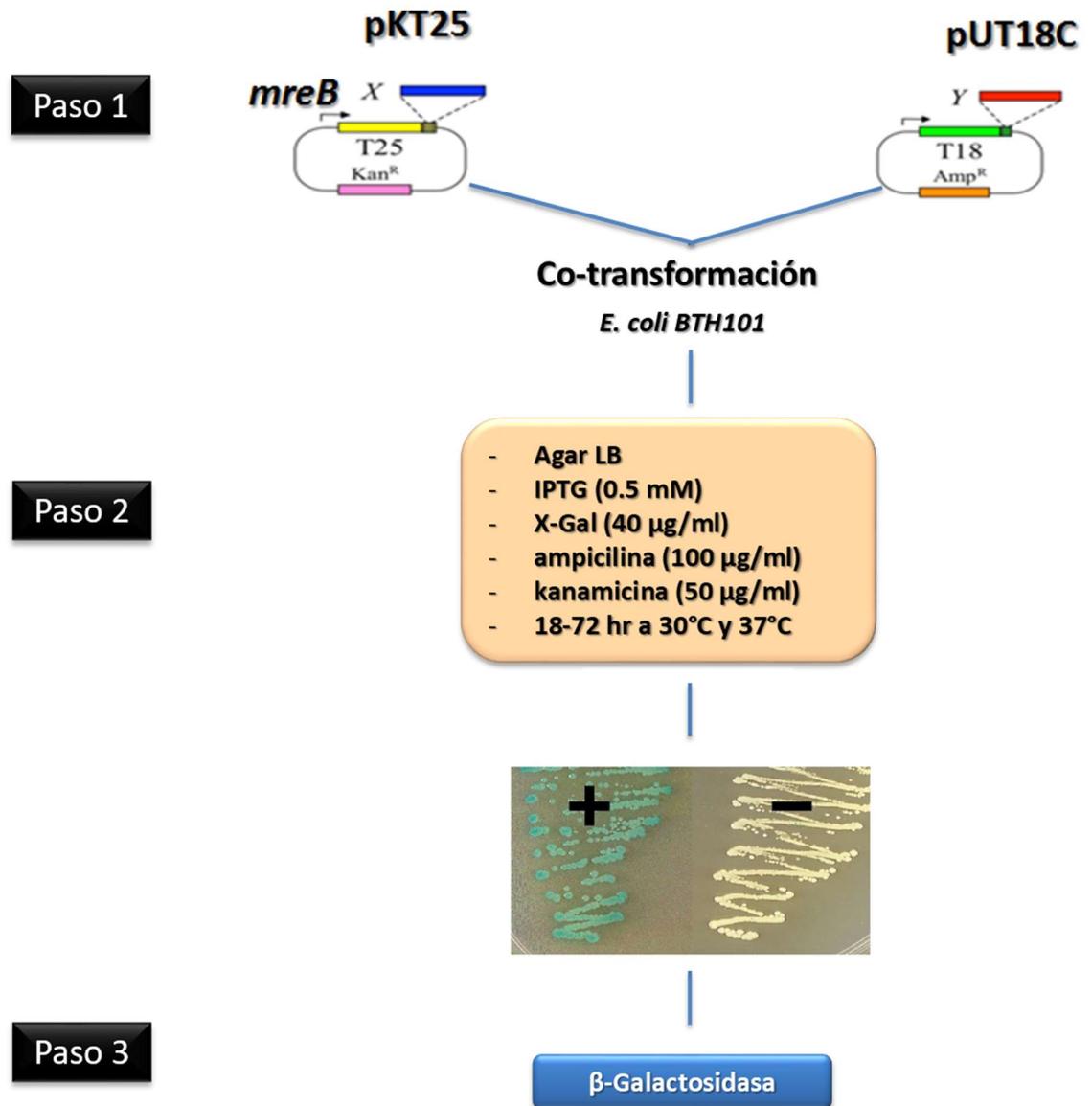


Figura 20. Confirmación de las interacciones del complejo proteico con MreB recombinante usando el sistema de doble híbrido en bacteria. El ensayo de doble híbrido en bacteria, se basa en el acoplamiento de las subunidades 25 y 18 de la enzima adenilato ciclasa de la bacteria *Bordetella pertusis*. Estas subunidades se encuentran en los vectores del estuche comercial *pKT25* y *pUT18C*, respectivamente. En el paso 1, *mreB* es fusionado con la subunidad 25 en uno de los vectores; mientras que cada gen del complejo y de forma individual, se fusiona a la subunidad 18. En el paso 2, las células de *E. coli BTH101* se co-transforman con las construcciones obtenidas y se cultivan en LB

suplementado con IPTG, X-gal, ampicilina y kanamicina, a dos temperaturas diferentes durante 18 a 72 horas. Finalmente, en el paso 3, si la interacción proteína-proteína se lleva a cabo, se acoplarán las subunidades de la adenilato ciclasa y se activará la proteína CAP (proteína activadora del catabolito). Esto dará como resultado la expresión de la enzima β -galactosidasa (colonias azules).

Una vez que se determinaron las proteínas del complejo que interaccionaban con MreB mediante doble híbrido en bacteria, se midió la actividad de la enzima β -galactosidasa para corroborar la interacción utilizando el protocolo reportado anteriormente por Miller 1992 y Karimova *et al.*, 2005. El procedimiento consistió en cultivar las células en 5 ml de LB suplementado con 0.5 mM de IPTG, ampicilina 100 μ g/mL y kanamicina 50 μ g/mL a 30°C en agitación constante (300 rpm) durante 18 horas. El cultivo se diluyó 1:5 con medio M63 1X tomado de un concentrado 5X (10g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 68g de KH_2PO_4 , 2.5 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg de vitamina B1 (tiamina), agua desionizada (1L)). Posteriormente se midió y registró la densidad óptica a 600 nm. Las células se permeabilizaron con 30 μ L de tolueno y 35 μ L de SDS al 0.1% por cada 2.5 mL de células diluidas. Se colocó un tapón de algodón al tubo que contenía las células y se mezcló empleando el vórtex Genie 2 durante 10 segundos. Las células permeabilizadas se incubaron a 37 °C en agitación (200 rpm) por 40 minutos para permitir la evaporación del tolueno. Se añadieron 100 μ L de células permeabilizadas a 900 μ L de medio PM2 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 70 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 30 mM, MgSO_4 1 mM, MnSO_4 0.2 mM pH 7.0 y β -mercaptoetanol 100 mM agregado antes de usar). Se utilizó 1 ml de PM2 como testigo negativo. Para empezar la reacción se añadieron 250 μ L de solución de ONPG pre-equilibrada a 30 °C (4 mg/mL de o-nitrofenol- β -galactósido en medio PM2). Se incubó la reacción a 28 °C por 5 minutos. Después de obtener suficiente color amarillo (15 min aproximadamente), se paró la reacción con 500 μ L de Na_2CO_3 1 M. Inmediatamente, se registró la densidad óptica a 420 nm para cada tubo, utilizando el testigo negativo como blanco. De esta manera, se pudo estimar la actividad enzimática mediante la fórmula:

$$U = [(200) (\text{D.O. } 420)] / [(\text{minutos de incubación}) (\text{factor de dilución})]$$

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Los resultados se expresaron en u/mg de peso seco de bacteria, tomando en cuenta que una D.O.₆₀₀ = 1, corresponde a 300 µg de peso seco de bacteria.

6.4 CONFIRMACIÓN DE LAS INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO CON MreB MEDIANTE BIOINFORMÁTICA

6.4.1 Elaboración del interactoma de MreB en *H. pylori* 26695

Las proteínas del complejo fueron identificadas y sus interacciones con MreB se confirmaron de manera experimental. Para establecer conexiones entre las proteínas identificadas y elaborar un interactoma para MreB, se empleó la base de datos STRING 10.5 para predecir interacciones *in silico* entre 86 proteínas del complejo obtenidas en el ensayo “pull-down”. Las interacciones de tipo directa o indirecta con un puntaje igual o mayor a 0.7 fueron tomadas en cuenta. Posteriormente, se utilizó el programa Cytoscape para esquematizar el interactoma.

6.4.2 Modelamiento por homología de MreB recombinante y predicción de motivos funcionales para su interacción con factores de virulencia en *H. pylori* 26695

Dentro de las proteínas del complejo identificadas experimentalmente, se encontraron 9 factores de virulencia de *H. pylori* 26695. Para establecer una interacción funcional entre estas proteínas y MreB, se generaron motivos *in silico* que pudieran predecir lo que ocurre *in vivo*. Por tanto, se realizó un modelamiento por homología de MreB recombinante usando el programa Geno 3D. El modelo obtenido se basó en la estructura cristalográfica de MreB de *Thermotoga marítima* (código PDB 1JCF) y de *Caulobacter crescentus* (código PDB 4CZE). El modelo fue visualizado en el programa PyMOL versión 1.2r3pre,

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Schrödinger LLC. Posteriormente, se empleó el programa Prism 2.0 (Ogmen *et al.*, 2005) para establecer los motivos de interacción entre MreB y los factores de virulencia que presentaban una estructura cristalográfica reportada previamente. Estos factores fueron UreB (código PDB 1E9Y) y VacA (código PDB 2QV3).

7. RESULTADOS

7.1 TRANSFORMACIÓN DE *H. pylori* 26695 CON *pJET-CF*

7.1.1 Confirmación de *pJET-CF* mediante secuenciación y restricción

A fin de identificar el complejo proteico de interacción con MreB de *H. pylori*, se propuso la estrategia de purificación en tándem de proteínas (TAP). Para efectuar esta técnica se utilizó la construcción *pJET-CF* generada previamente en otro trabajo de investigación. Antes de ser utilizada, la construcción fue confirmada por secuenciación automatizada y se sometió a un análisis tipo BLAST. De esta manera, se identificó que la misma se conformaba de 700 pb de *mreB*, la etiqueta para purificación en tándem de proteínas (TAP), el codón de parada para *mreB*, el gen codificante para la enzima 3-aminofosfotransferasa (que le confiere resistencia a kanamicina), el gen completo de *mreC* y una parte del gen *HP1371* (helicasa). La construcción constó de 3100 pb de longitud total (Figura 21).

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

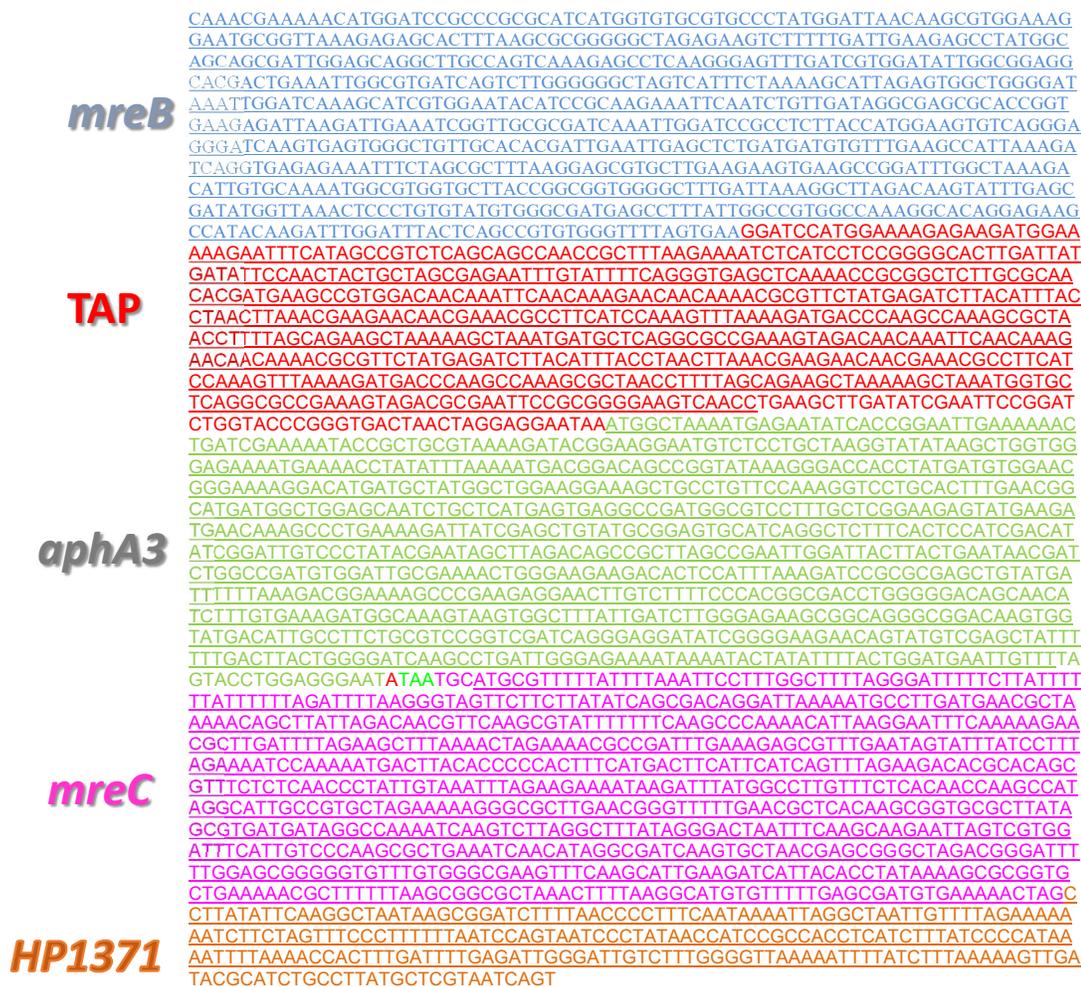


Figura 21. Secuencia nucleotídica de *pJET-CF*. La secuencia constó un total de de 3100 pb, incluyendo 700 pb de *mreB* (azul), 555 pb de TAP (rojo), gen codificante para 3-aminofosfotransferasa o *aphA3* (verde), el gen completo *mreC* (747 pb) (magenta) y una parte del gen *HP1371* (naranja).

La construcción *pJET-CF* fue también confirmada mediante digestión con *EcoRI*, la cual corta entre *mreB* y la etiqueta TAP. Se obtuvieron 2 fragmentos de 4744 pb y 1300 pb, respectivamente (Figura 22).

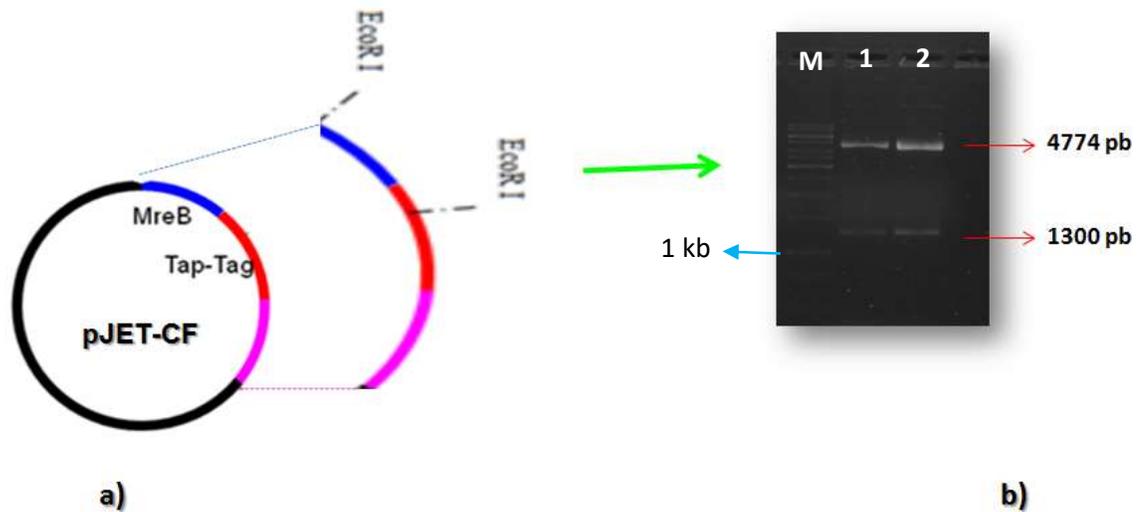


Figura 22. Confirmación de *pJET-CF* por restricción. a) *EcoRI* corta entre *mreB* y la etiqueta TAP. b) La restricción, realizada por duplicado, originó 2 fragmentos de 4774 pb y 1300 pb (carriles 1 y 2), respectivamente. El marcador de peso molecular se muestra en el carril M. Los fragmentos se visualizaron en agarosa al 1% teñida con bromuro de etidio 5 μ M.

7.1.2 Transformación natural de *H. pylori* 26695

Se ensayó la transformación natural de *H. pylori* 26695 con *pJET*-CF a fin de efectuar la TAP en esta bacteria. En cada paso de la transformación natural se realizaron tinciones Gram para corroborar si existía crecimiento bacteriano (Figura 23). Se observó biomasa bacteriana cultivando al microorganismo en agar sangre con o sin suplemento selectivo OXOID® para *H. pylori*. Sin embargo, una vez que se resembró en agar sangre suplementado con kanamicina, a fin de corroborar la transformación natural, el crecimiento fue nulo.

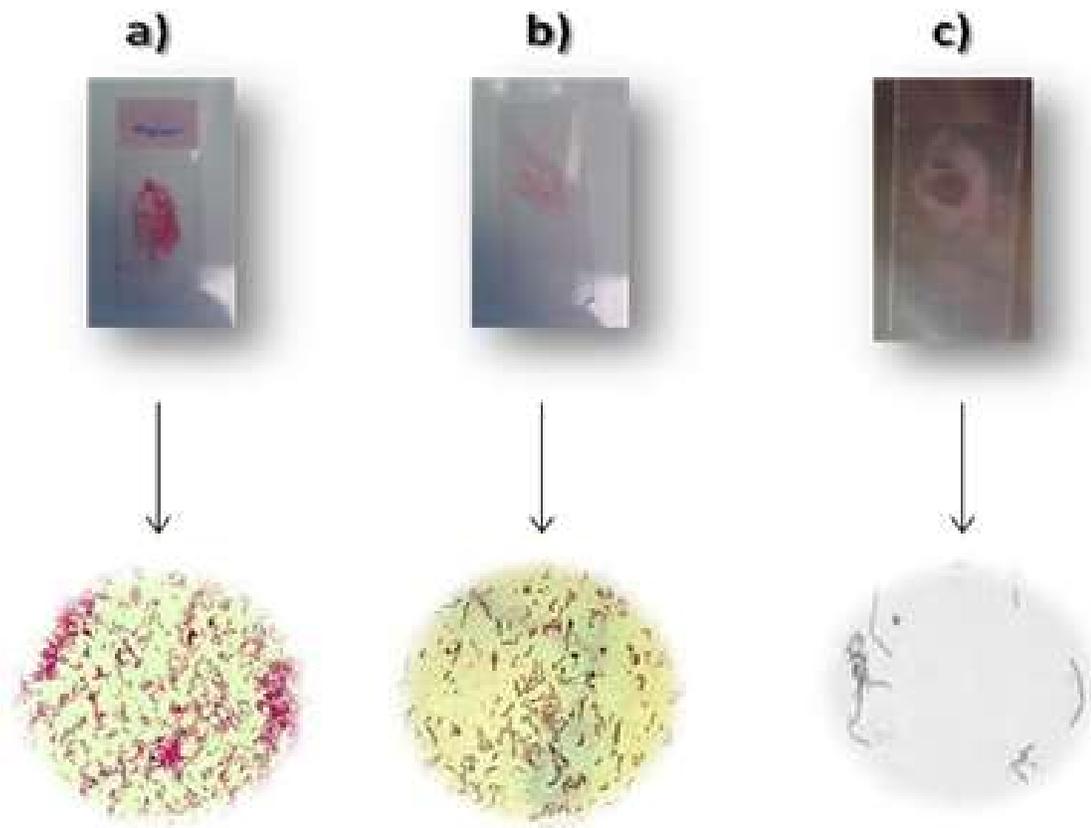


Figura 23. Tinción Gram durante la transformación natural de *H. pylori* 26695. Tinción de la bacteria observada al microscopio con objetivo 100X, al ser cultivada durante 2 días **a)** en agar sangre con suplemento selectivo, **b)** en agar sangre sin

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

suplemento selectivo y **c)** en agar sangre suplementado con kanamicina, donde no se registró crecimiento del microorganismo.

7.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO ASOCIADO A MreB DE *H. pylori* 26695 Y CONFIRMACIÓN *IN VITRO* MEDIANTE EL SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO BACTERIANO

7.2.1 Confirmación de las construcciones generadas para el “pull-down”

La implementación de TAP para identificar el complejo proteico de interacción con MreB no pudo efectuarse, debido a que la transformación natural de *H. pylori* 26695 con *pJET-CF* pudo haber sido letal para la bacteria. Como alternativa se empleó el ensayo “pull-down”. Las construcciones generadas para la aplicación de esta técnica fueron *pETmreBr* y *pETgst*. La primera fue resultado de la clonación de *mreB* en *pSCA* y su subclonación en *pET19b*; mientras que la segunda se obtuvo añadiendo una etiqueta GST a *mreB* subclonado en *pET19b*.

Previo a la obtención de las construcciones para el ensayo “pull-down”, se amplificó *mreB* a partir de ADN genómico de *H. pylori* 26695 y se observó en agarosa al 0.7%, presentando el peso molecular deseado (Figura 24). El producto de PCR se clonó exitosamente en *pSCA* de StrataClone® (originando *pSCAmreB*) y se subclonó en *pET19b* (dando lugar a *pETmreB*). La transformación de *E. coli* *DH5α* con dichas construcciones fue corroborada mediante PCR en colonia, en donde de 15 colonias, 12 fueron transformantes (Figura 25 y 26). Las construcciones generadas fueron confirmadas por PCR de *mreB* y por restricción con *NdeI* y *XhoI*. Las bandas obtenidas fueron de los pesos moleculares esperados (Figura 27 y 28). Así mismo, se secuenció *mreB* clonada en *pETmreB* y a partir de la secuencia nucleotídica obtenida, se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la proteína usando el programa ExpASy. Ambas secuencias fueron comparadas con las reportadas en el NCBI (por sus siglas en inglés National Center of

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Bioinformatic Information) con número de identificación 900312 (para el gen) y NP_208164.1 (para la proteína). El alineamiento de secuencias arrojó un 100% de identidad (Figuras 29 y 30).

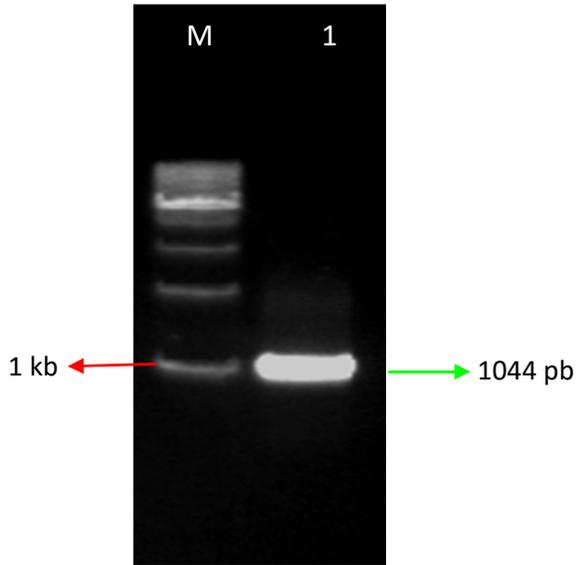


Figura 24. Amplificación del gen *mreB*. Los resultados se visualizaron en agarosa al 0.7% e incluyeron el marcador de peso molecular de 1 kb (M) y el producto de PCR de *mreB* (carril 1).

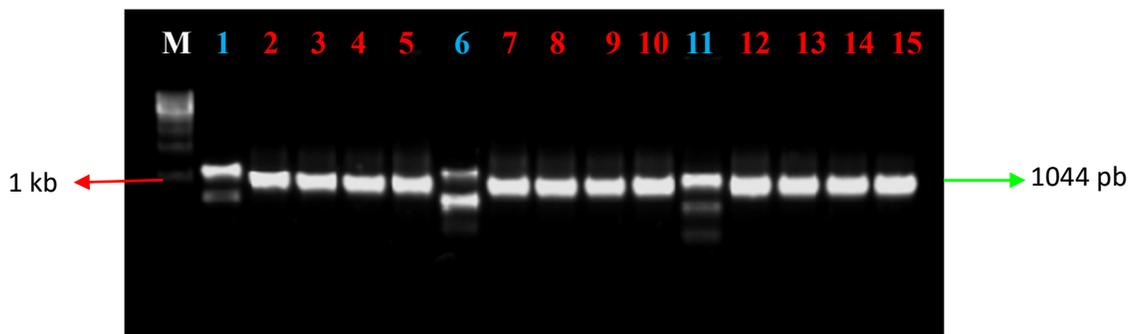


Figura 25. PCR en colonia de las colonias transformantes para *pSCAmreB*. La figura muestra un gel de agarosa al 0.7% que contiene el marcador de peso molecular de 1 kb (M) y las PCR en colonia para transformación con *pSCAmreB* (carriles 1-15) Los carriles

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

en rojo indican las colonias transformantes, mientras que los de color azul muestran aquellas que no contenían la construcción.

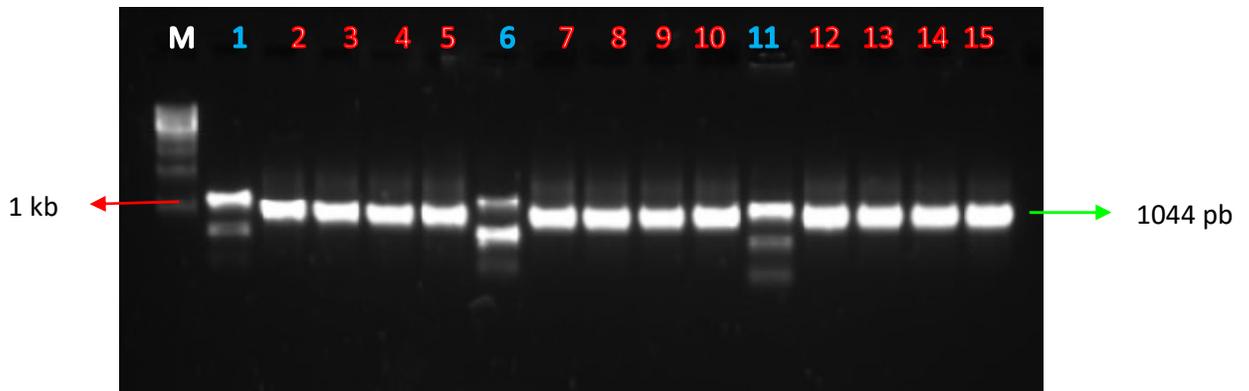


Figura 26. PCR en colonia para la identificación de células *E. coli DH5a* transformantes con *pTEMreB*. La figura muestra un gel de agarosa al 0.7% que contiene el marcador de peso molecular de 1 kb (M) y las PCR en colonia para transformación con *pETmreB* (carriles 1-15) Los carriles en rojo indican las colonias transformantes, mientras que los de color azul muestran aquellas que no contenían la construcción.

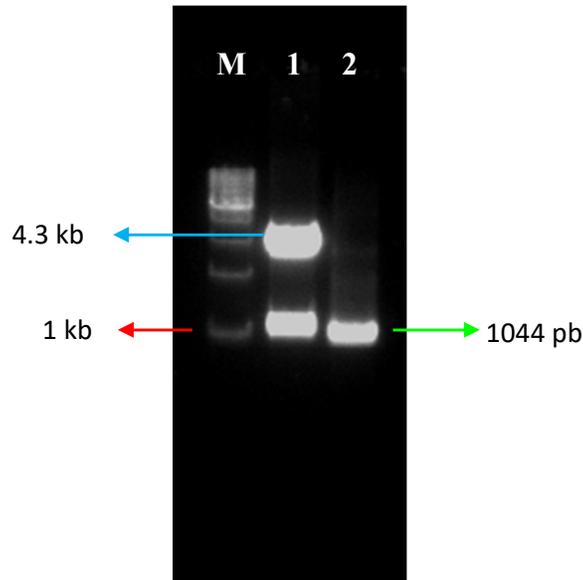


Figura 27. Confirmación de *pSCAmreB* por restricción con *NdeI* y *XhoI*. En el gel de agarosa al 0.7% se observa el marcador de peso molecular de 1 kb (M) y la digestión de la construcción en donde pueden notarse el vector y *mreB* por separado (carril 1) y el producto de PCR de *mreB* (carril 2). Nótese que existe coincidencia entre el peso molecular del fragmento digerido y el peso del producto amplificado.

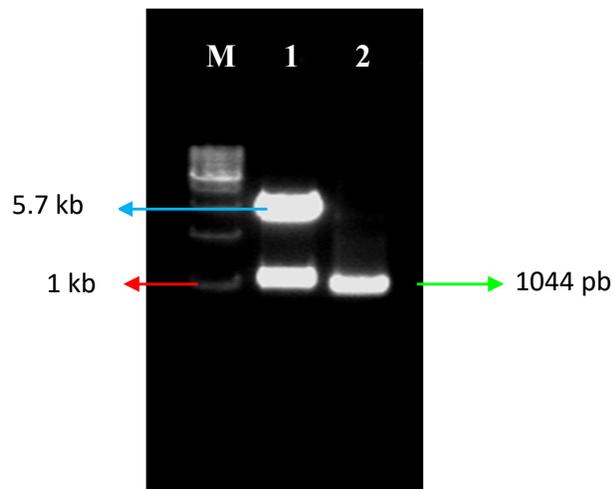


Figura 28. Confirmación de *pETmreB* por restricción con *NdeI* y *XhoI*. En el gel de agarosa al 0.7% se observa el marcador de peso molecular de 1 kb (M), la digestión de la

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

construcción en donde el vector y *mreB* se encuentran separados (carril 1) y el producto de PCR de *mreB* (carril 2). Nótese que existe coincidencia entre el peso molecular del fragmento digerido y el peso del amplicón.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (*MreB*) en *Helicobacter pylori*

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

MreB_NCBI      ATGATTTTGTAGCAAATTGATCGGTTTGTTCGCATGATATTGCCATAGATTAGGCACG 60
MreB_colonia2  ATGATTTTGTAGCAAATTGATCGGTTTGTTCGCATGATATTGCCATAGATTAGGCACG 60
*****

MreB_NCBI      GCTAACACGATCGTGTAGTCAAAGGGCAGGGCATTATTATCAATGAGCCTTCTATTGTG 120
MreB_colonia2  GCTAACACGATCGTGTAGTCAAAGGGCAGGGCATTATTATCAATGAGCCTTCTATTGTG 120
*****

MreB_NCBI      GCGGTGCGCATGGGATTGTTGATTCTAAAGCTTATGATATTTGGCAGTGGGAGCGAG 180
MreB_colonia2  GCGGTGCGCATGGGATTGTTGATTCTAAAGCTTATGATATTTGGCAGTGGGAGCGAG 180
*****

MreB_NCBI      GCTAAAGAAATGCTAGGCAAACCCCTAACAGCATCAGAGCGATTGCGCCCATGAAAGAT 240
MreB_colonia2  GCTAAAGAAATGCTAGGCAAACCCCTAACAGCATCAGAGCGATTGCGCCCATGAAAGAT 240
*****

MreB_NCBI      GCGGTGATCGCCGNTTATGACATTACCGCTAAAATGATCCGCTACTTTATTGAAAAAGTG 300
MreB_colonia2  GCGGTGATCGCCGNTTATGACATTACCGCTAAAATGATCCGCTACTTTATTGAAAAAGTG 300
*****

MreB_NCBI      CACAAACGAAAAACATGGATCCGCCCGCGCATCATGGTGTGCGTGCCTATGGATTAACA 360
MreB_colonia2  CACAAACGAAAAACATGGATCCGCCCGCGCATCATGGTGTGCGTGCCTATGGATTAACA 360
*****

MreB_NCBI      AGCGTGGAAAGGAATGCGGTTAAAGAGAGCACTTAAAGCGGGGGCTAGAGAAGTCTTT 420
MreB_colonia2  AGCGTGGAAAGGAATGCGGTTAAAGAGAGCACTTAAAGCGGGGGCTAGAGAAGTCTTT 420
*****

MreB_NCBI      TTGATTGAAGAGCCTATGGCAGCAGCGATTGGAGCAGGCTTCCAGTCAAAGAGCCTCAA 480
MreB_colonia2  TTGATTGAAGAGCCTATGGCAGCAGCGATTGGAGCAGGCTTCCAGTCAAAGAGCCTCAA 480
*****

MreB_NCBI      GGGAGTTGATCGTGGATATTGGCGGAGGCACGACTGAAATGGCGTGATCAGTCTTGGG 540
MreB_colonia2  GGGAGTTGATCGTGGATATTGGCGGAGGCACGACTGAAATGGCGTGATCAGTCTTGGG 540
*****

MreB_NCBI      GGGCTAGTCATTTCTAAAAGCATTAGAGTGGCTGGGGATAAATGGATCAAAGCATCGTG 600
MreB_colonia2  GGGCTAGTCATTTCTAAAAGCATTAGAGTGGCTGGGGATAAATGGATCAAAGCATCGTG 600
*****

MreB_NCBI      GAATACATCCGCAAGAAATCAATCTGTTGATAGCGGAGCGCACCGGTGAAGAGATTAAG 660
MreB_colonia2  GAATACATCCGCAAGAAATCAATCTGTTGATAGCGGAGCGCACCGGTGAAGAGATTAAG 660
*****

MreB_NCBI      ATTGAAATCGGTTGCGCGATCAAATGGATCCGCCTCTTACCATGGAAGTGTGAGGAGG 720
MreB_colonia2  ATTGAAATCGGTTGCGCGATCAAATGGATCCGCCTCTTACCATGGAAGTGTGAGGAGG 720
*****

MreB_NCBI      GATCAAGTGAGTGGGCTGTTGCACACGATTGAATTGAGCTCTGATGATGTTGAAGCC 780
MreB_colonia2  GATCAAGTGAGTGGGCTGTTGCACACGATTGAATTGAGCTCTGATGATGTTGAAGCC 780
*****

MreB_NCBI      ATTAAGATCAGGTGAGAGAAATTTCTAGCGCTTAAAGGAGCCTGCTTGAAGAAGTGAAG 840
MreB_colonia2  ATTAAGATCAGGTGAGAGAAATTTCTAGCGCTTAAAGGAGCCTGCTTGAAGAAGTGAAG 840
*****

MreB_NCBI      CCGGATTTGGCTAAAGACATTTGCAAAAATGCGGTGGTGTCTTACCGCGGTGGGGCTTG 900
MreB_colonia2  CCGGATTTGGCTAAAGACATTTGCAAAAATGCGGTGGTGTCTTACCGCGGTGGGGCTTG 900
*****

MreB_NCBI      ATTAAGGCTTAGACAAGTATTTGAGCGATATGGTTAAACTCCCTGTGTATGTTGGCGGAT 960
MreB_colonia2  ATTAAGGCTTAGACAAGTATTTGAGCGATATGGTTAAACTCCCTGTGTATGTTGGCGGAT 960
*****

MreB_NCBI      GAGCCTTTATTGGCCGTGGCCAAAGGCACAGGAGAAGCCATACAAGATTTGGATTTACTC 1020
MreB_colonia2  GAGCCTTTATTGGCCGTGGCCAAAGGCACAGGAGAAGCCATACAAGATTTGGATTTACTC 1020
*****

MreB_NCBI      AGCCGTGGGTTTTAGTGAATAA 1044
MreB_colonia2  AGCCGTGGGTTTTAGTGAATAA 1044
*****

```

Figura 29. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de *mreB* con la reportada en el NCBI. La comparación de nucleótidos en ambas secuencias mantuvo un 100% de identidad.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

MreB_NCBI      MIFSKLIGLFSHDIAIDLGTANTIVLVKGGIIINEPSIVAVRMGLFDSKAYDILAVGSE 60
MreB_colonia2 MIFSKLIGLFSHDIAIDLGTANTIVLVKGGIIINEPSIVAVRMGLFDSKAYDILAVGSE 60
*****

MreB_NCBI      AKEMLGKTPNSIRAIRPMKDGVIADYDITAKMIRYFIEKVHKKRTWIRPRIMVCFPYGLT 120
MreB_colonia2 AKEMLGKTPNSIRAIRPMKDGVIADYDITAKMIRYFIEKVHKKRTWIRPRIMVCFPYGLT 120
*****

MreB_NCBI      SVERNAVKESTLSAGAREVFLIEEPMAAAIGAGLPVKEPQGS LIVDIGGGTTEIGVISLG 180
MreB_colonia2 SVERNAVKESTLSAGAREVFLIEEPMAAAIGAGLPVKEPQGS LIVDIGGGTTEIGVISLG 180
*****

MreB_NCBI      GLVISKSIRVAGDKLDQSIVEYIRKKFNLLIGERTGEEIKIEIGCAIKLDPPLTMEVSGR 240
MreB_colonia2 GLVISKSIRVAGDKLDQSIVEYIRKKFNLLIGERTGEEIKIEIGCAIKLDPPLTMEVSGR 240
*****

MreB_NCBI      DQVSGLLHTIELSSDDVFEAIKDQVREISSALRSVLEEVKPD LAKDIVQNGVVL TGGGAL 300
MreB_colonia2 DQVSGLLHTIELSSDDVFEAIKDQVREISSALRSVLEEVKPD LAKDIVQNGVVL TGGGAL 300
*****

MreB_NCBI      IKGLDKYLSDMVKLPVYVGDEPLLAVAKGTGEAIQDL D LLSRVGFSE 347
MreB_colonia2 IKGLDKYLSDMVKLPVYVGDEPLLAVAKGTGEAIQDL D LLSRVGFSE 347
*****

```

Figura 30. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de MreB con la reportada en el NCBI. La comparación de aminoácidos en ambas secuencias mantuvo un 100% de identidad.

A la construcción *pETmreB* obtenida, se le agregó una etiqueta GST. Para tal fin se amplificó el gen *gst* a partir del vector *pAcghLTB*, obteniendo el peso molecular esperado (Figura 31). El producto de amplificación fue clonado en el vector *pSCA* (originando *pSCAgst*) y subclonado en *pET19b* (generando *pETgst*). Ambas construcciones se emplearon para transformar células de *E. coli DH5α*. Las colonias transformantes con *pSCAgst* fueron confirmadas mediante PCR en colonia para *gst* y con los iniciadores M13 se confirmó la construcción *pETgst*. De esta manera, se obtuvieron 6 colonias transformantes de 10 totales analizadas para *pSCAgst*; mientras que todas las colonias (8 colonias) contenían la construcción *pETgst*. (Figura 32). Ambas construcciones se verificaron por restricción con *NdeI*, obteniendo como resultado dos fragmentos del

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

tamaño molecular esperado, concernientes al vector y al inserto, respectivamente (Figura 33 y 34).

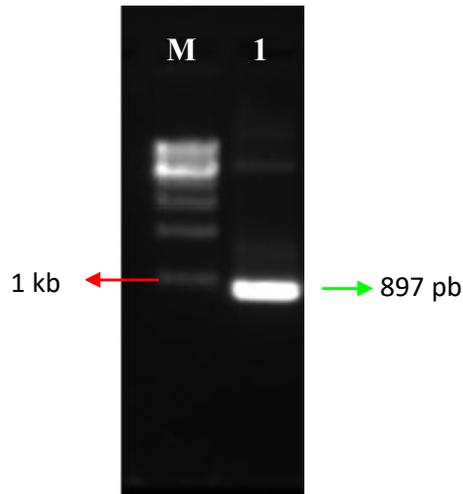


Figura 31. Producto de amplificación *gst* a partir de *pAcghLT-B*. Los resultados fueron visualizados en agarosa al 0.7% e incluyeron el marcador de peso molecular de 1 kb (M) y el producto de PCR de *mreB* (carril 1).

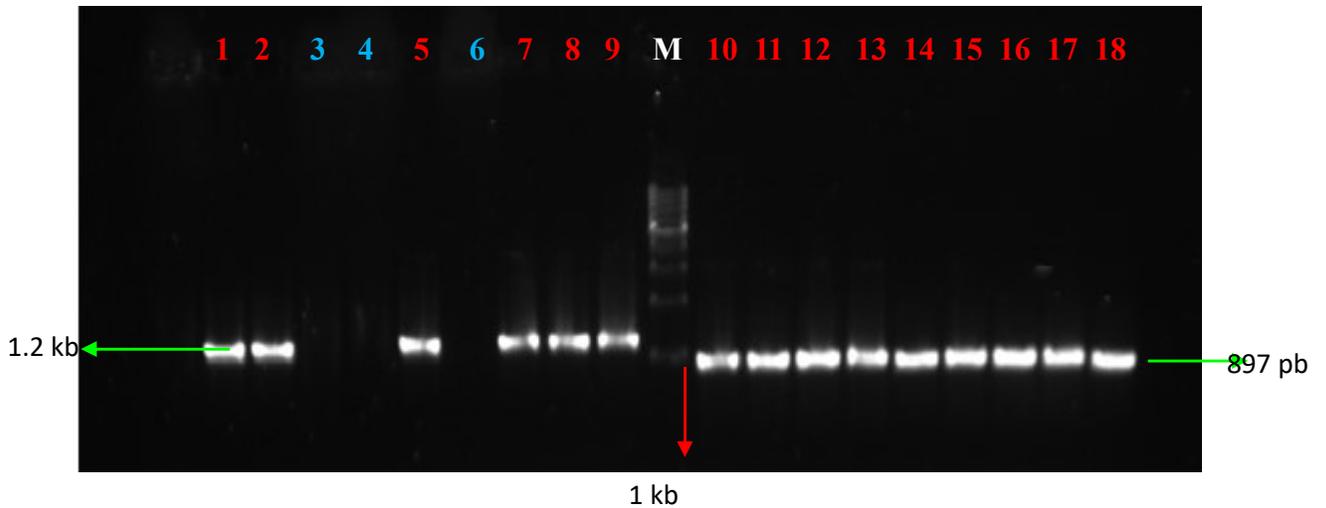


Figura 32. PCR en colonia para la identificación de células *E. coli DH5a* transformantes con *pSCAgst* y con *pETgst*. La figura muestra un gel de agarosa al 0.7% que contiene el marcador de peso molecular de 1 kb (M), los productos de PCR en colonia para transformación con *pSCAgst* (carriles 1-9) y con *pETgst* (carriles 10-18). Los carriles en rojo indican las colonias transformantes, mientras que los de color azul muestran aquellas que no contenían la construcción.

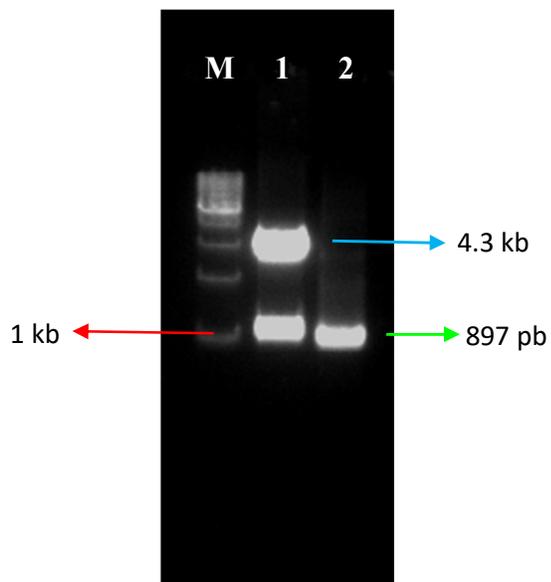


Figura 33. Confirmación de *pSCAgst* por restricción con *NdeI*. En el gel de agarosa al 0.7% se observa el marcador de peso molecular (M) de 1 kb, la digestión de la construcción en donde puede observarse el vector y *gst*, por separado (carril 1) y el producto de PCR de *gst* (carril 2). Nótese que existe coincidencia entre el peso molecular del fragmento digerido y el peso del amplicón.

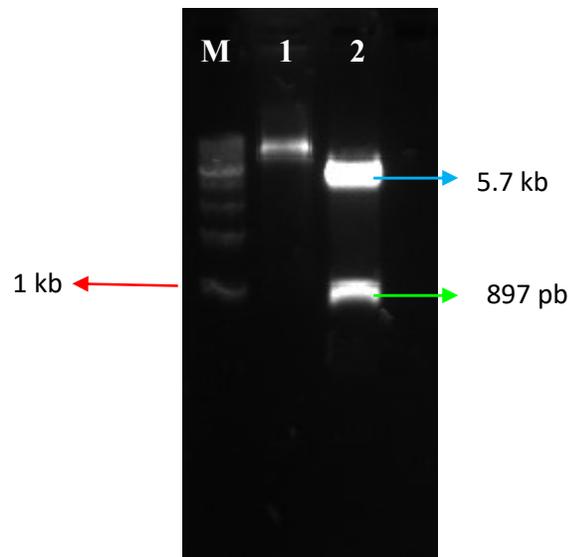


Figura 34. Confirmación de *pETgst* por restricción con *NdeI*. En el gel de agarosa al 0.7% se observa el marcador de peso molecular (M) de 1 kb, el vector digerido (carril 1) y la digestión de la construcción en donde puede observarse el vector y *gst*, por separado (carril 2).

Una vez verificadas las construcciones generadas con *gst*, dicho gen fue secuenciado a partir de *pETgst*. La secuencia obtenida se alineó con la del vector *pAcghLT-B*, en donde no se presentó ningún cambio en la secuencia nucleotídica, excepto en los tres últimos nucleótidos, los cuales fueron deletados para no interrumpir la expresión (Figura 35).

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

ORIGINAL          ATGTCCCCCTATACTAGGTTTATTGGAAAATTAAGGGCCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTT 60
COLONIA7          ATGTCCCCCTATACTAGGTTTATTGGAAAATTAAGGGCCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTT 60
*****

ORIGINAL          TTGGAATATCTTGAAGAAAATATGAAGAGCATTGTGTATGAGCGCGATGAAGGTTGATAAA 120
COLONIA7          TTGGAATATCTTGAAGAAAATATGAAGAGCATTGTGTATGAGCGCGATGAAGGTTGATAAA 120
*****

ORIGINAL          TGGCGAACAACAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTAATTTGAT 180
COLONIA7          TGGCGAACAACAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTAATTTGAT 180
*****

ORIGINAL          GGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGSCCATCATACGTTATATAGCTGACAAAGCACAAC 240
COLONIA7          GGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGSCCATCATACGTTATATAGCTGACAAAGCACAAC 240
*****

ORIGINAL          ATGTTGGGTTGGTTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCATGCTTGAAGGAGCGGTTTGG 300
COLONIA7          ATGTTGGGTTGGTTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCATGCTTGAAGGAGCGGTTTGG 300
*****

ORIGINAL          GATATTAGATACGGTGTITTCGAGAAATTGCATATAGTAAAGACITTTGAAGCTCTCAAGTT 360
COLONIA7          GATATTAGATACGGTGTITTCGAGAAATTGCATATAGTAAAGACITTTGAAGCTCTCAAGTT 360
*****

ORIGINAL          GATTTTCTTAOCAAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTTCAAGATCGTTTATGTTCATAAA 420
COLONIA7          GATTTTCTTAOCAAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTTCAAGATCGTTTATGTTCATAAA 420
*****

ORIGINAL          ACATATTTAAATGCTGATCATGTAACCCATCCCTGACTTCATGTTGTATGACCGCTCTTGT 480
COLONIA7          ACATATTTAAATGCTGATCATGTAACCCATCCCTGACTTCATGTTGTATGACCGCTCTTGT 480
*****

ORIGINAL          GTTGTTTTATACATGGACCCAAATGTGCTTGGATGCGTTCCCAAATTTAGTITTTTAAA 540
COLONIA7          GTTGTTTTATACATGGACCCAAATGTGCTTGGATGCGTTCCCAAATTTAGTITTTTAAA 540
*****

ORIGINAL          AAACGTATTGAAGCTATGCCACAAATTTGATAAGTACTTGAATCCAGCAAGTATATAGCA 600
COLONIA7          AAACGTATTGAAGCTATGCCACAAATTTGATAAGTACTTGAATCCAGCAAGTATATAGCA 600
*****

ORIGINAL          TGGCCTTTGCAGGGCTTGGCAAGCCAGTITGGTGGTGGCGACCATCTCCAAAATCGGAT 660
COLONIA7          TGGCCTTTGCAGGGCTTGGCAAGCCAGTITGGTGGTGGCGACCATCTCCAAAATCGGAT 660
*****

ORIGINAL          CCGATGGGACATCATCAICATCATCACGGAGGGAGAGGGGOCAGTGTGGCGCGGGAAAT 720
COLONIA7          CCGATGGGACATCATCAICATCATCACGGAGGGAGAGGGGOCAGTGTGGCGCGGGAAAT 720
*****

ORIGINAL          TTGGTCCCTCGTGGAGSODCAGACTCGATGGCATATATGCTCGAGGAATTCAGGOCCTOC 780
COLONIA7          TTGGTCCCTCGTGGAGSODCAGACTCGATGGCATATATGCTCGAGGAATTCAGGOCCTOC 780
*****

ORIGINAL          ATGGGAGCTCCGCGCCGCTGCAGGGTACCCCCGGGAGATCTGTACCGACTCTGCTGAG 840
COLONIA7          ATGGGAGCTCCGCGCCGCTGCAGGGTACCCCCGGGAGATCTGTACCGACTCTGCTGAG 840
*****

ORIGINAL          AGGAGGAAATCTCCTTGAAGTTTCCCTGGTGTCAAATTA 882
COLONIA7          AGGAGGAAATCTCCTTGAAGTTTCCCTGGTGTCAAATTA 879
*****
    
```

Figura 35. Alineamiento de la secuencia de *gst* obtenida con la de *gst* del vector *pAcghLT-B*. Dentro del círculo rojo se muestran los tres nucleótidos deletados.

Como testigo negativo para el ensayo “pull-down” se empleó a *pETgst*. A partir de esta construcción se originó una nueva que sería empleada en el mismo ensayo. De esta manera se subclonó a *gst* (partiendo de *pETgst*) en *pETmreB* (generando *pETmreBr*. La construcción fue empleada para transformar células de *E. coli DH5a*. Las colonias transformantes fueron confirmadas mediante PCR en colonia con los iniciadores para *gst*

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

y los T7. Como resultado se obtuvo una sola colonia transformante de 15 analizadas (Figura 36). Posteriormente, se realizó la purificación de la construcción contenida en la colonia transformante y se realizó una amplificación para determinar la orientación del inserto. Para ello, en la reacción de PCR se utilizaron los iniciadores GST sentido (GSTF) y MreB antisentido (MreBR). La orientación de *gst* en *pETmreBr* fue la correcta, debido a que se obtuvo la amplificación del peso molecular esperado (1941 pb) (Figura 37).

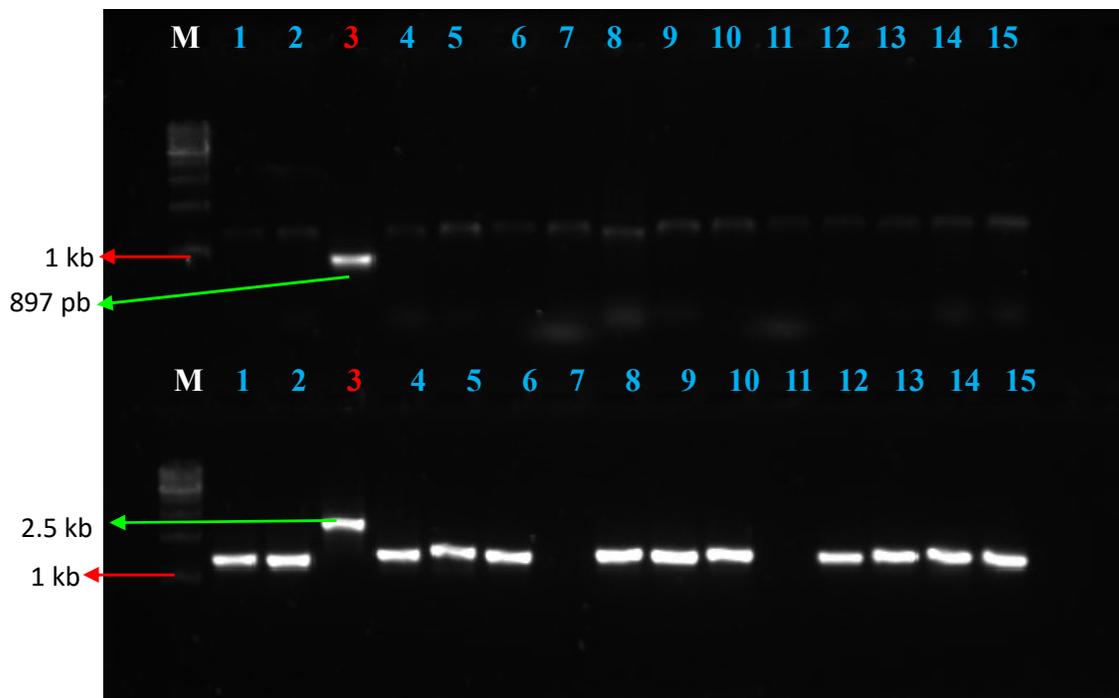


Figura 36. PCR en colonia para la identificación de células *E. coli DH5α* transformantes con *pETmreBr*. La figura muestra un gel de agarosa al 0.7% que contiene el marcador de peso molecular de 1 kb (M), los productos de PCR en colonia para la transformación con *pSCAgst* usando los iniciadores GSTF-GSTR (carriles 1-15 parte superior) y los iniciadores T7F-T7R (carriles 1-15 parte inferior) con *pETgst* (carriles 10-18). Los carriles en rojo indican las colonias transformantes, mientras que los de color azul muestran aquellas que no contenían la construcción.

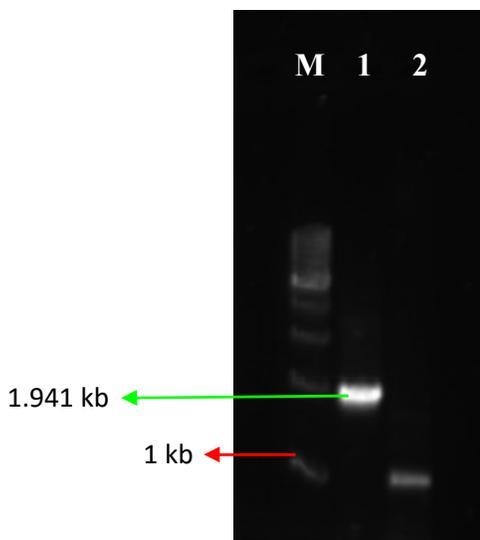


Figura 37. Confirmación de la orientación de *gst* en *pETmreBr* mediante PCR. En el gel de agarosa al 0.7 % se observó en el carril 1 la amplificación concerniente a la dirección de inserción correcta de *gst* en *pETmreBr* (usando los iniciadores GSTF-MreBR). En el carril 2 puede notarse la orientación opuesta (GSTR-MreBR), en donde no hubo amplificación.

7.2.2 Sobre-expresión y purificación de las proteínas recombinantes MreB y GST

Las construcciones *pETmreBr* y *pETgst* se requirieron para sobre-expresar MreB y GST recombinantes, respectivamente. Un análisis previo de uso de codones mostró que MreB contenía 8 codones considerados como “raros” para arginina (AGG, AGG y CGA) en los tripletes 73, 103, 124, 137, 189,240, 266 y 273. Así mismo, se identificaron 2 de estos codones para leucina (CTA) en los tripletes 65 y 182; otros 3 para isoleucina (ATA) en los tripletes 211 y 334 y dos más para prolina (CCC) en los tripletes 77 y 116. El resultado fue un total de 15 codones raros en esta proteína (Figura 38).

RaCC results:

Red = rare Arg codons **AGG, AGA, CGA**

Green = rare Leu codon **CTA**

Blue = rare Ile codon **ATA**

Orange = rare Pro codon **CCC**

for the following input sequence:

```
atg att ttt agc aaa ttg atc ggt ttg ttt tcg cat gat att gcc ATA gat tta ggc acg
gct aac acg atc gtg tta gtc aaa ggg cag ggc att att atc aat gag cct tct att gtg
gcg gtg cgc atg gga ttg ttt gat tct aaa gct tat gat att ttg gca gtg ggg agc gag
gct aaa gaa atg CTA ggc aaa acc cct aac agc atc AGA gcg att cgc CCC atg aaa gat
ggc gtg atc gcc gat tat gac att acc gct aaa atg atc cgc tac ttt att gaa aaa gtg
cac aaa CGA aaa aca tgg atc cgc ccg cgc atc atg gtg tgc gtg CCC tat gga tta aca
agc gtg gaa AGG aat gcg gtt aaa gag agc act tta agc gcg ggg gct AGA gaa gtc ttt
ttg att gaa gag cct atg gca gca gcg att gga gca ggc ttg cca gtc aaa gag cct caa
ggg agt ttg atc gtg gat att ggc gga ggc acg act gaa att ggc gtg atc agt ctt ggg
ggg CTA gtc att tct aaa agc att AGA gtg gct ggg gat aaa ttg gat caa agc atc gtg
gaa tac atc cgc aag aaa ttc aat ctg ttg ATA ggc gag cgc acc ggt gaa gag att aag
att gaa atc ggt tgc gcg atc aaa ttg gat ccg cct ctt acc atg gaa gtg tca ggg AGG
gat caa gtg agt ggg ctg ttg cac acg att gaa ttg agc tct gat gat gtg ttt gaa gcc
att aaa gat cag gtg AGA gaa att tct agc gct tta AGG agc gtg ctt gaa gaa gtg aag
ccg gat ttg gct aaa gac att gtg caa aat ggc gtg gtg ctt acc ggc ggt ggg gct ttg
att aaa ggc tta gac aag tat ttg agc gat atg gtt aaa ctc cct gtg tat gtg ggc gat
gag cct tta ttg gcc gtg gcc aaa ggc aca gga gaa gcc ATA caa gat ttg gat tta ctc
agc cgt gtg ggt ttt agt gaa taa
```

Figura 38. Uso diferente de codones en MreB de *H. pylori* 26695. La figura muestra un total de 15 usos de codones diferentes en los tripletes codificantes para arginina, leucina, isoleucina y prolina.

La información sobre el uso de codones para MreB en *H. pylori* 26695 sugirió las cepas de *E. coli* para la sobre-expresión heteróloga. Cabe mencionar que GST no presentó un uso de codones diferente. De las cepas elegidas, únicamente en *Codon Plus* se sobre-expresó MreB recombinantes; mientras que las cepas *BL21(DE3)* y *Rosetta gami* no fueron útiles en este experimento (Figura 39).

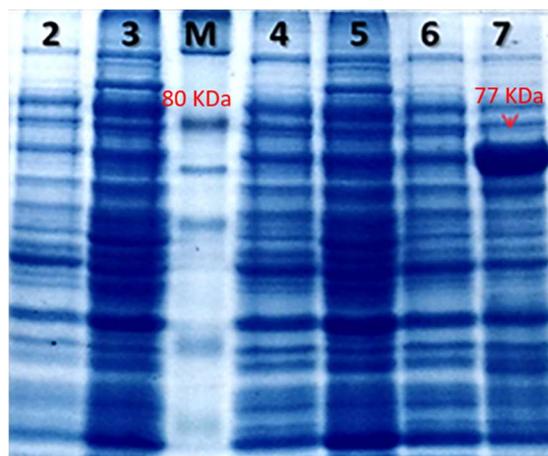


Figura 39. Sobre-expresión de MreB recombinante en *E. coli Codon Plus*. En el gel de poliacrilamida al 10% se muestra el marcador de peso molecular (M) y la comparación entre las proteínas totales antes (carriles 2, 4 y 6) y después de la inducción de la sobre-expresión de MreB recombinante (carriles 3, 5 y 7) en las cepas de *E. coli BL21(DE3)* (carriles 2 y 3), *Rosetta gami* (carriles 4 y 5) y *Codon Plus* (carriles 6 y 7). Puede notarse que únicamente en ésta última cepa se registró sobre-expresión de la proteína de 77 KDa.

Una vez sobre-expresada MreB, se determinó junto con GST, si la mayor parte de cada una de ellas se localizaba en la fracción soluble o insoluble. El resultado fue que MreB se encontró en su mayoría en la fracción insoluble, sin embargo, la cantidad aproximada ubicada en la fracción soluble era suficiente para proceder a la purificación. Por el contrario, GST se concentró casi en su totalidad en la fracción soluble celular (Figura 40). Cabe recalcar que la sobre-expresión de GST y la identificación de la fracción celular en la que se encontraba, fue realizada con éxito y al mismo tiempo, únicamente en *E. coli Codon Plus*. Por tanto, la purificación de MreB se realizó a partir de ambas fracciones celulares; mientras que la de GST se efectuó únicamente de la fracción soluble (Figura 41).

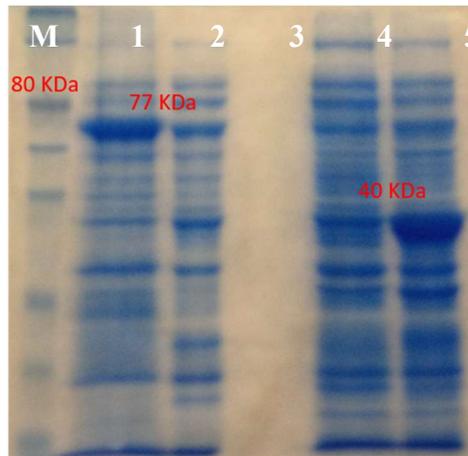


Figura 40. Identificación de la fracción soluble e insoluble de las proteínas recombinantes MreB y GST. En el gel de poliacrilamida al 10% se muestra el marcador de peso molecular (M) y que la mayor parte de MreB se ubica en la fracción insoluble (carril 1) y no en la soluble (carril 2). Por el contrario, GST (40KDa) se localiza casi en su totalidad en la fracción soluble (carril 5) y no en la insoluble (carril 4). El carril 3 se encuentra vacío para separar ambos ensayos.

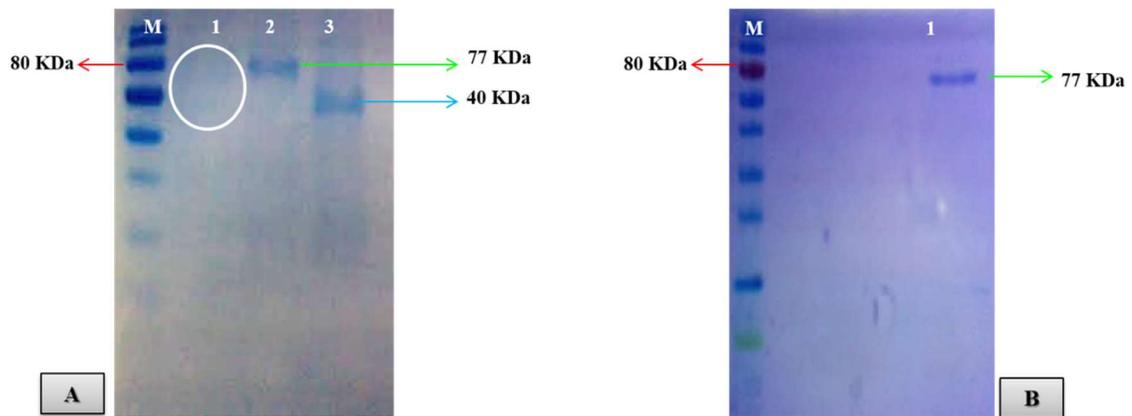


Figura 41. Purificación de las proteínas MreB y GST recombinantes. A) En el gel de poliacrilamida al 10% se muestra el marcador de peso molecular (M) y la purificación de MreB obtenida de la fracción insoluble (carril 2) y GST de la soluble (carril 3). La purificación de MreB de la fracción soluble contenía muy poca cantidad, por lo que no fue visible de forma clara (carril 1). B) En un segundo gel, se muestra la misma proteína

MreB obtenida de la fracción soluble, 4 veces más concentrada y claramente visible (carril 1).

7.2.3 Cuantificación y determinación del plegamiento y estructuración de las proteínas recombinantes MreB y GST.

Antes de proceder a realizar el ensayo de interacción proteína-proteína, se dializaron en una solución de fosfatos las proteínas recombinantes purificadas con anterioridad. Después de que la solución de diálisis les aportara un medio propicio para su conformación, se determinó si el plegamiento de ambas proteínas era el correcto y se cuantificaron las mismas, usando el método de fluorescencia. Como resultado, se obtuvo un total de 44 $\mu\text{g/mL}$ de MreB obtenida de la fracción soluble y 56 $\mu\text{g/mL}$ de la insoluble; mientras que para GST de la fracción soluble se cuantificaron 64 $\mu\text{g/mL}$. Además, se registraron en el fluorómetro los espectros para las fracciones solubles e insolubles de MreB y la soluble de GST. Los espectros obtenidos en las proteínas recombinantes, indicaron que el centro espectral de masas (CEM) para GST presentó una longitud de onda de 346.98079 nm, de 349.098609 nm para MreB obtenida de la fracción soluble y 350.41109 nm para MreB obtenida a partir de la fracción soluble (Figura 42a). Comparando los espectros de MreB, los CEM fueron variables a pesar de que se trataba de la misma proteína. De esta manera, el CEM de MreB de la fracción insoluble se visualizó desplazado hacia la derecha de la gráfica si se comparaba con el espectro de la fracción soluble de la proteína (Figura 42b).

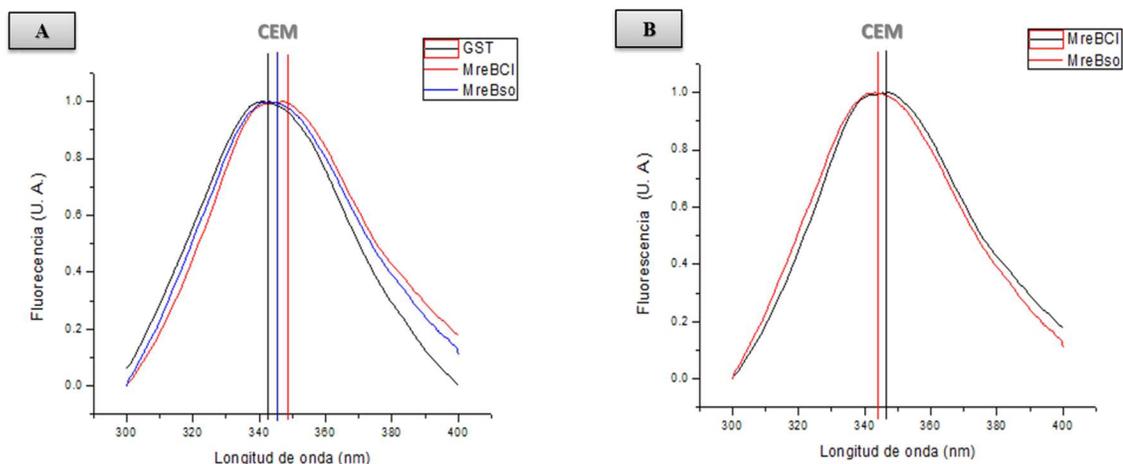


Figura 42. Espectros de fluorescencia de las proteínas recombinantes MreB y GST.

En las figuras se puede notar que se graficó la longitud de onda (nm) contra la fluorescencia (unidades arbitrarias) en los espectros de las proteínas recombinantes. A) La gráfica muestra en conjunto los espectros de fluorescencia de GST soluble (negro), MreB soluble (azul) y MreB insoluble (rojo). Las líneas que atraviesan perpendicularmente a los espectros indican los CEM para cada proteína, dependiendo del color que presenten. B) En la gráfica se comparan los espectros de las fracciones soluble (rojo) e insoluble (negro) de MreB. Nótese el desplazamiento a la derecha de del espectro de MreB obtenida de la fracción insoluble.

Las diferencias en los espectros de fluorescencia de MreB, sugirieron utilizar a la proteína obtenida de la fracción soluble para el ensayo “pull-down”. Para corroborar los resultados de fluorescencia, se sometió a un análisis de la estructura secundaria a MreB y GST empleando el dicroísmo circular. Los resultados fueron congruentes con los espectros de fluorescencia ya que mostraron que las fracciones solubles de ambas proteínas presentaron una estructura definida aparente, no siendo el caso de la fracción insoluble de MreB, en donde se identificó una estructura presuntamente distorsionada (Figura 43). Para corroborar que los espectros de MreB presentaban diferencias basadas en un incorrecto plegamiento y falta de estructuración en la fracción insoluble, se obtuvo la elipticidad media de los residuos en el programa Origin 8.0. Los resultados

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

corroboraron que el espectro de la fracción insoluble de MreB, no se apegaba al esperado según la estructura secundaria de la proteína (Figura 44).

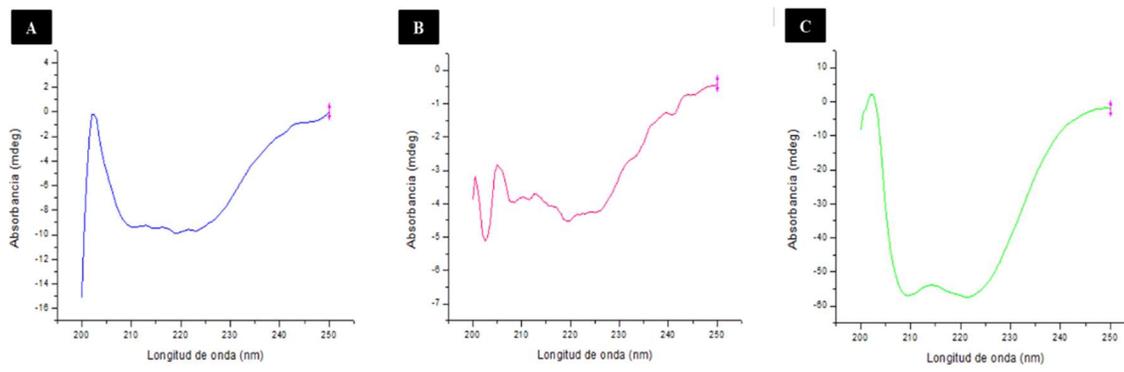


Figura 43. Espectros de dicroísmo circular de las proteínas recombinantes MreB y GST. . En las figuras se muestra que se graficó la longitud de onda (nm) contra la absorbancia (mdeg) en los espectros de MreB de la fracción soluble (A), MreB de la fracción insoluble (B) y GST de la fracción soluble (C). La línea graficada representa la estructura secundaria de cada proteína analizada. Nótese que se presentó una estructuración adecuada para MreB y GST de la fracción soluble, al contrario de lo que ocurrió con MreB de la fracción insoluble (donde la línea se visualizó distorsionada).

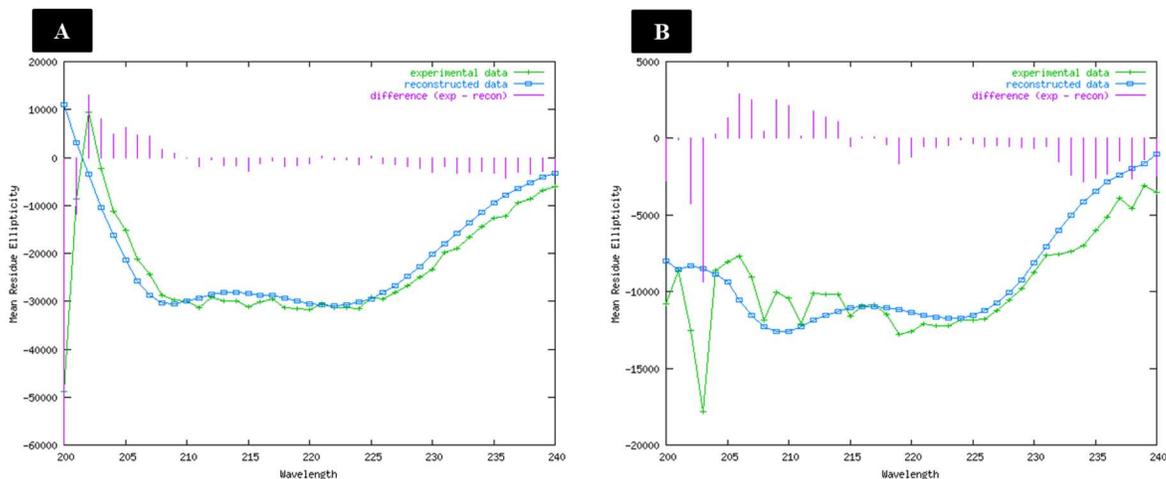


Figura 44. Elipticidad media de residuos en MreB recombinante. Las figuras muestran que se graficó la longitud de onda (nm) contra la elipticidad media de los residuos (mdeg) en la fracción soluble (A) e insoluble (B) de MreB recombinante. Nótese que la estructuración obtenida en la fracción soluble (línea en color verde) se aproxima a la estructura reconstruida en el programa Origin 8.0 (línea en color azul) y que la diferencia entre ambas (línea en color violeta) es menor en comparación con la generada en la fracción insoluble.

En el dicroísmo circular, la estructura secundaria fue representada mediante espectros de absorbancia. Sin embargo, la técnica permitió también identificar el porcentaje de componentes de la estructura secundaria. Este resultado fue comparado con la predicción estructural que arrojó el programa Phyre 2. Como resultado, los porcentajes fueron aproximados entre los componentes estructurales experimentales y aquellos que se predijeron (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de la predicción de los porcentajes de los componentes de la estructura secundaria de MreB y GST recombinantes, arrojados por Phyre 2 y Dichroweb .

| Estructura | Predicción MreB | Experimental MreB soluble | Experimental MreB insoluble | Predicción GST | Experimental GST |
|------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|
| α -hélice | 32.1 % | 33 % | 28 % | 87 % | 90 % |
| Hojas β | 18.46 % | 20 % | 14 % | 0 % | 0 % |
| Bucles | 49.23 % | 47 % | 58 % | 13 % | 10 % |

7.2.4 Identificación de las proteínas del complejo de interacción con MreB recombinante.

Dado que los resultados de fluorescencia y dicroísmo circular mostraron que las fracciones solubles de las proteínas recombinantes podían presentar una mejor conformación que la las fracciones solubles, éstas fueron empleadas para el ensayo “pull-down”. En este ensayo, se empleó a GST recombinante como testigo negativo; mientras que MreB recombinante se usó para establecer interacciones con el complejo de proteínas a identificar. Los resultados arrojaron un total de 86 proteínas agrupadas en varias bandas visualizadas en un gel de poliacrilamida al 10% (Figura 45). Las proteínas fueron identificadas mediante espectrometría de masas (Cuadro 8) y se identificaron las siguientes funciones: proteólisis, metabolismo de carbohidratos, uso de amonio, plegamiento de proteínas, protección contra radicales libre, metabolismo de aminoácidos, síntesis de ácidos grasos, síntesis de proteínas, producción de ATP, replicación y reparación del ADN, transporte celular y otras funciones tales como la patogénesis (en

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

donde figuraron los factores de virulencia GroEL, HydB, HylB, KatA, SpeA, ThrC, TsaA, UreB y VacA).

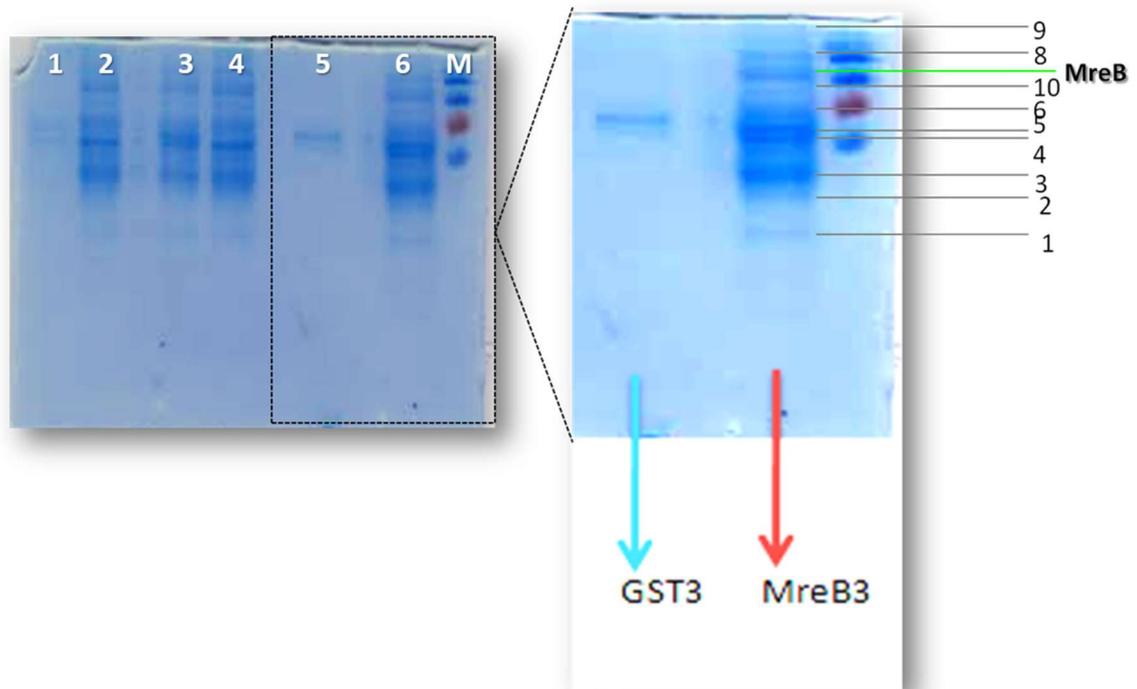


Figura 45. Resultado del ensayo “pull-down” empleando MreB y GST recombinantes. La figura muestra un gel de poliacrilamida al 10%, en donde el ensayo de interacción proteína-proteína realizado por triplicado fue visualizado (carriles 2, 3 y 4). En el carril 1 se visualiza el testigo negativo (utilizando GST recombinante). El carril 5 y 6 corresponden a la repetición de las muestras de los carriles 1 y 2, respectivamente, mismos que son ampliados en la parte derecha de la figura. En la ampliación se observan 10 bandas, incluyendo la correspondiente a MreB recombinante, que fueron identificadas por espectrometría de masas.

Cuadro 8. Proteínas del complejo de interacción con MreB recombinante en *Helicobacter pylori* 26695.

| Número de acceso | Nombre de la proteína | Descripción de la proteína |
|-------------------------------------|-----------------------|--|
| PROTEÓLISIS | | |
| 506309209 | HP0657 | peptidasa M16 |
| 447191513 | HP1012 | proteasa |
| 487827615 | HP1350 | peptidasa S1 |
| 640514459 | HtrA | serina proteasa |
| 446055941 | Lon | Lon proteasa |
| 446835636 | PepA | aminopeptidasa A |
| 558870962 | PepF | oligoendopeptidasa F |
| METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS | | |
| 487841271 | AcnB | aconitato hidratasa 2/2-metilisocitrato deshidratasa bifuncional |
| 447080458 | Dld | lactato deshidrogenasa |
| 447046832 | Edd | fosfogluconato deshidratasa |
| 446878417 | Eno | enolasa |
| 446306922 | Fbp | fructosa-1 6-bisfosfatasa |
| 544750030 | GltA | citrato sintasa tipo II |
| 447188703 | HP1104 | alcohol deshidrogenasa NADP-dependiente |
| 544892299 | HP1275 | Fosfo-mutasa |
| 446246102 | Icd | isocitrato deshidrogenasa |
| 544743620 | MQO | malatoquinona oxidoreductasa |
| 447129614 | OorA | 2-oxoglutarato ferredoxin oxidoreductasa subunidad alfa |
| 446802808 | Pgk | fosfoglicerato cinasa |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | | |
|---|-------|---|
| 447191892 | PpsA | fosfoenolpiruvato sintasa |
| USO DE AMONIO | | |
| 447140264 | AspA | aspartato amonio-liasas |
| 447049304 | CarB | carbamoil fosfato sintasa subunidad mayor |
| 446295346 | PyrG | CTP sintasa |
| PATOGENESIS | | |
| 446963023 | GroEL | chaperona molecular |
| 446385389 | HydB | Hidrogenasa 2 subunidad mayor |
| 645089572 | HylB | hemolisina |
| 446169497 | KatA | catalasa |
| 447081295 | SpeA | arginina descarboxilasa |
| 447040089 | ThrC | treonina sintasa |
| 446884377 | TsaA | peroxidasa |
| 505456207 | UreB | ureasa subunidad beta |
| 446215818 | VacA | Proteína vacuolizante |
| PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS | | |
| 446929022 | ClpX | Proteasa ATP-dependiente |
| 446970499 | Tig | Factor activador |
| 446970787 | ClpB | Chaperona molecular |
| 445992752 | HtpG | Proteína de choque térmico |
| PROTECCIÓN CONTRA RADICALES LIBRES | | |
| 446789356 | MsrB | péptido metionin sulfóxido reductasa |
| 446486560 | TrxB | Tioredoxin reductasa |
| METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS | | |
| 665878502 | AnsA | L-asparaginasa II |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | | |
|------------------|--------|--|
| 447082296 | DapA | dihidrodipicolinato sintasa |
| 446245237 | GlyA | serina hidroximetiltransferasa |
| 447092136 | HP0056 | 1-pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasa |
| 446207226 | HP0397 | 3-fosfoglicerato deshidrogenasa |
| 446046483 | HP1111 | piruvato ferredoxin oxidoreductasa, subunidad beta |
| 645073978 | SDH | sacaropina deshidrogenasa |
| 446662070 | SlyD | peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerasa |

SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

| | | |
|------------------|------|------------------------------|
| 504540059 | AccC | biotina carboxilasa |
| 657258413 | FabH | malonil CoA-ACP transacilasa |

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

| | | |
|------------------|------|---|
| 446276945 | AlaS | alanil-ARNt sintetasa |
| 447179169 | AspS | aspartil-ARNt sintetasa |
| 446024019 | FusA | Factor de elongación P |
| 446559767 | GlnA | glutamina sintetasa |
| 446477405 | GlyS | glicil-ARNt sintetasa subunidad beta |
| 446588922 | IleS | isoleucil-ARNt sintetasa |
| 447216120 | InfB | factor de inicio de la translación IF-2 |
| 446267860 | LeuS | leucil--ARNt sintetasa |
| 446414727 | LysS | lisil-tRNA synthetase |
| 447095341 | MetG | methionil-ARNt sintetasa |
| 639861128 | PheT | fenilalanil-ARNt sintetasa subunidad beta |
| 558870742 | RpsA | 30S proteina ribosomal S1 |
| 558870885 | ThrS | treonil-ARNt sintetasa |
| 446963323 | TufA | Factor de elongación Tu |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | | |
|--|---------------|---|
| 487800865 | ValS | valil-ARNt sintetasa |
| PRODUCCIÓN DE ATP | | |
| 446002613 | AtpA | FOF1 ATP sintasa subunidad alfa |
| 487787270 | AtpD | FOF1 ATP sintasa subunidad beta |
| 447001476 | Ppk | Polifosfato cinasa |
| REPLICACIÓN Y REPARACIÓN DE ADN | | |
| 545063614 | HP0275 | Exonucleasa |
| 545062492 | DnaE | ADN polimerasa III, subunidad alfa |
| 446626840 | DnaN | ADN polimerasa III, subunidad beta |
| 640515831 | GuaB | inosin-5-monofosfato deshidrogenasa |
| 447104768 | GyrB | ADN girase subunidad B |
| 446970183 | AddB (HP1089) | ATP-dependiente helicasa/desoxirribonucleasa subunidad B |
| 505457244 | NrdA | ribonucleótido-difosfato reductasa subunidad alfa |
| 544893699 | PolA | ADN polimerasa I |
| 645074929 | AddA | ATP-dependiente helicasa/desoxirribonucleasa subunidad A, similar a RecBCD (RecB) |
| 658419387 | UvrA | Sistema UvrABC subunidad A |
| TRANSPORTE CELULAR | | |
| 446884517 | CeuE | Proteína de union al sustrato del transportador de hierro |
| 446510682 | SecA | Pre-proteína translocasa subunidad SecA |
| OTRAS FUNCIONES | | |
| 446102892 | CcoO | citocromo C oxidasa subunidad II |
| 501547817 | HP0276 | clorohidrolasa |
| 447127091 | HP0396 | proteína hipotética |
| 446036904 | HP0468 | proteína hipotética |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | | |
|------------------|--------|---|
| 487826843 | HP0645 | mureína lítica transglicosilasa |
| 447207846 | HP0696 | acetona carboxilasa subunidad alfa |
| 446533763 | HP0792 | regulador transcripcional de la familia Fis |

7.2.5 Confirmación de las interacciones de las proteínas del complejo asociado con MreB.

La espectrometría de masas arrojó un total de 86 proteínas, entre las cuales se encontraron 9 factores de virulencia. Del total de proteínas se seleccionaron 25 de ellas, de acuerdo con la relevancia funcional (principalmente la patogénesis), para confirmar *in vitro* sus interacciones con MreB. Para tal fin, se empleó la técnica de doble híbrido en bacteria. En esta técnica fue necesaria la generación de construcciones en los vectores del estuche comercial usado (Euromedex®). Las construcciones constaron de *mreB* y los genes codificantes para cada una de las 25 proteínas clonados en pSCA de StrataClone® y su subclonación en *pKT25* de Euromedex® (en el caso de *mreB*) y *pUT18C* (25 genes). Cabe mencionar que se incluyeron 2 genes más para clonarlos en *pUT18C* (*mreB* y *mreC*). Las construcciones fueron confirmadas mediante PCR en colonia. De esta forma, se seleccionaron 10 colonias transformantes por cada gen clonado, dando 270 reacciones de PCR por clonación, lo que equivale a 540 reacciones en total para confirmar dichas construcciones. En este trabajo se muestra la amplificación de cada uno de los 27 genes (figura 46) y algunas PCR en colonia representativas, en donde los pesos moleculares coincidieron con los esperados (Figura 47).

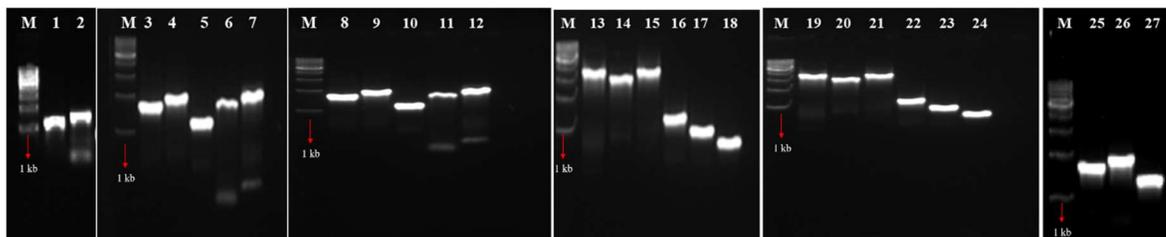


Figura 46. Amplificación de los productos de PCR de los 27 genes usados en las construcciones del doble híbrido en bacteria. En los geles de agarosa al 0.7 % se muestra el marcador de peso molecular de 1 kb (M) y los genes amplificados (carriles 1-27, respectivamente) *eno* (1281 pb), *clpX* (1341 pb), *htpG* (1866 pb), *speA* (1848 pb), *hylB* (1302 pb), *hydB* (1737 pb), *ureB* (1710 pb), *groEL* (1641 pb), *gyrB* (2322 pb), *fis* (1521 pb), *tufA* (1200 pb), *guaB* (1446 pb), *carB* (3258 pb), *clpB* (2571 pb), *vacA* (3873 pb), *mreB* (1044 pb), *ansA* (993 pb), *tsaA* (594 pb), *katA* (1518 pb), *pepA* (1491 pb), *thrC* (1458 pb), *tigF* (1356 pb), *fabH* (993 pb), *mreC* (747 pb), *HP1111* 942 pb), *accC* (1368 pb) y *addA* (945 pb).

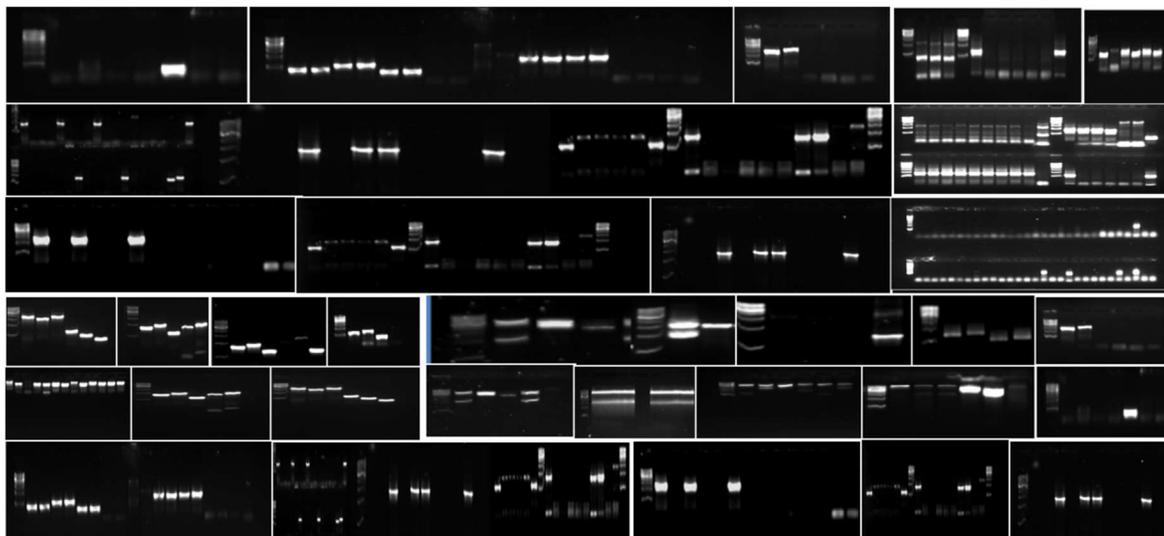


Figura 47. PCR en colonia para confirmar las construcciones generadas con los 27 genes, usadas en el doble híbrido en bacteria. Los geles de agarosa al 0.7 % muestran una parte (304 reacciones) de las 540 PCR en colonia que se realizaron para confirmar las construcciones.

Una vez que las construcciones fueron confirmadas, se realizó el ensayo de doble híbrido por triplicado, para verificar las interacciones proteína-proteína obtenidas en el “pull-down”. Los resultados mostraron que, de las 27 proteínas analizadas para confirmar interacción con MreB, 6 presentaron un resultado positivo (UreB, AddA, VacA, HydB, HylB y MreB). Por tanto, se determinó la actividad de la enzima β -galactosidasa en las colonias transformantes para las construcciones con los 6 genes codificantes para dichas proteínas. El resultado de la actividad enzimática corroboró la interacción positiva, siendo que la cuantificación de las unidades de enzima por peso seco de bacteria fue significativamente mayor en los 6 ensayos, en comparación con sus respectivos testigos negativos (Figura 48). Los valores comparativos de la actividad enzimática para los 6 ensayos de interacción se indican en el Cuadro 9.

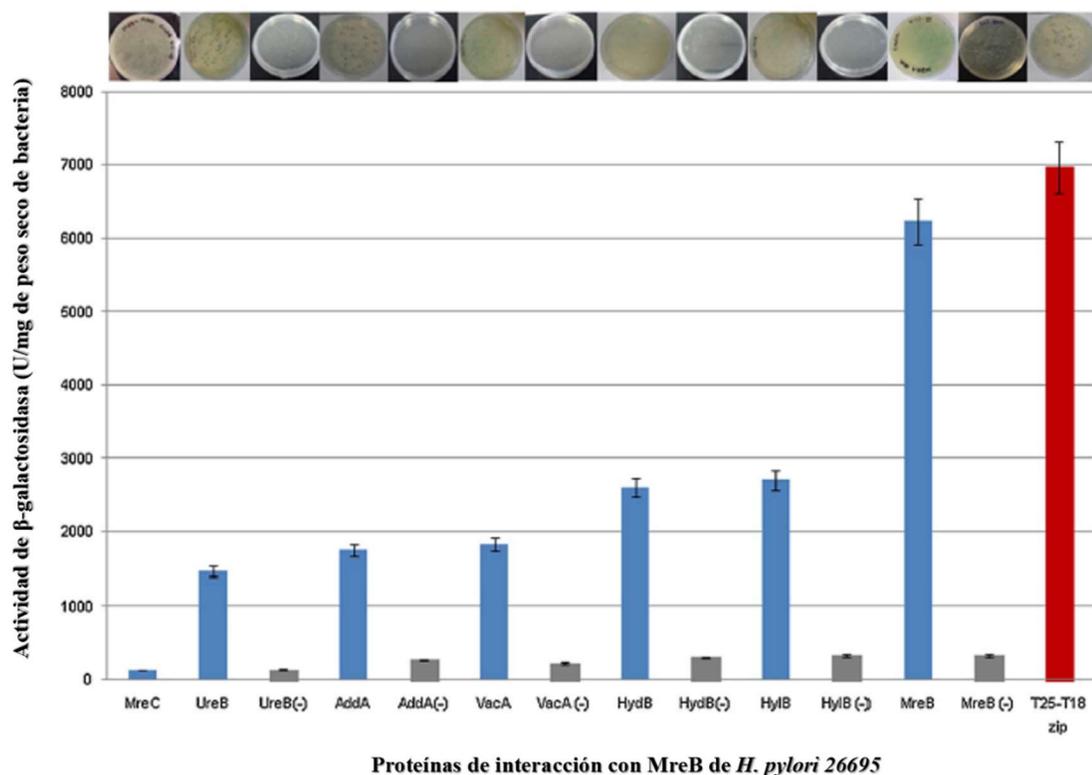


Figura 48. Confirmación de las interacciones de proteínas con MreB empleando el doble híbrido en bacteria. En la parte superior de la figura se muestra el resultado del ensayo de doble híbrido, en donde las colonias azules indican una interacción positiva y las blancas una interacción negativa. En la parte inferior se observa graficada la actividad de la enzima β -galactosidasa en cada una de las proteínas que presentaron interacción positiva con MreB. Cada barra representa el promedio de 3 ensayos. Las barras de error indican la desviación estándar a partir del promedio. Las barras azules muestran las interacciones positivas con MreB, las grises el testigo negativo (-) y la roja el testigo positivo.

Cuadro 9. Valores comparativos de la actividad de β -galactosidasa determinada en las proteínas de interacción positiva con MreB.

| Proteína de interacción con MreB | Actividad de βgalactosidasa (U/mg de peso seco de bacteria) | Desviación estándar (U/mg de peso seco de bacteria) |
|---|---|--|
| MreC | 134.4299 | 2.6020 |
| UreB | 1263.9358 | 139.5449 |
| UreB (-) | 138.6268 | 9.2839 |
| AddA | 1541.6326 | 104.2526 |
| AddA (-) | 305.5128 | 6.6639 |
| VacA | 1821.8919 | 62.5660 |
| VacA (-) | 249.5394 | 4.5883 |
| HydB | 2471.1403 | 112.2813 |
| HydB (-) | 373.9615 | 5.7894 |
| HylB | 2664..2295 | 72.8041 |
| HylB (-) | 358.3884 | 28.4249 |
| MreB | 6395.1348 | 227.2685 |
| MreB (-) | 384.1296 | 7.7079 |
| Testigo positivo | 7187.2810 | 11.3152 |

7.3 PREDICCIÓN DE INTERACCIONES ENTRE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE ASOCIACIÓN A MreB DE *H. pylori* 26695

El ensayo de doble híbrido en bacteria, mostró que no existió interacción directa de MreB con todas las proteínas del complejo. Por lo que se realizó un análisis *in silico* para identificar las asociaciones indirectas entre esta proteína y el complejo determinado por espectrometría de masas. Los resultados fueron esquematizados mediante el programa Cytoscape. El resultado fue un interactoma de MreB en donde se visualizaron grupos de proteínas con funciones divididas de igual forma que en el Cuadro 16 (Figura 49)

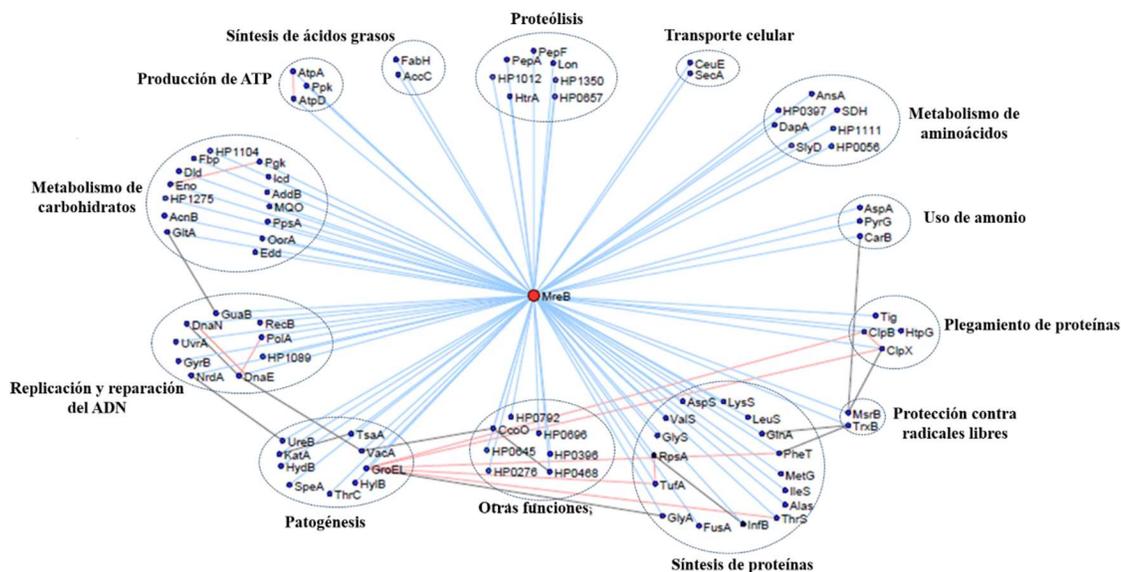


Figura 49. Interactoma de MreB de *H. pylori* 26695 generado en Cytoscape. La figura muestra a MreB en el centro del interactoma (círculo rojo) y a las proteínas del complejo que tienen interacción directa (líneas en color azul) e indirecta (líneas en color negro) con esta proteína. Las líneas en color rojo indican las interacciones indirectas de los factores de virulencia identificados en el complejo. Todas las proteínas se muestran organizadas en grupos funcionales.

7.4 PREDICCIÓN DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA ENTRE MreB Y FACTORES DE VIRULENCIA DEL COMPLEJO EN *H. pylori* 26695

7.4.1 Modelamiento por homología de MreB de *H. pylori* 26695.

La confirmación de interacciones de MreB con 6 proteínas por doble híbrido incluyó 4 factores de virulencia (UreB, VacA, HydB y HylB). Este resultado es congruente con la hipótesis del trabajo. Por tanto, se decidió elaborar un modelo por homología de MreB recombinante para determinar si la proteína tenía motivos funcionales de interacción con los factores de virulencia confirmados. La estructura secundaria del modelo tridimensional generado por el programa Geno 3D fue visualizado en PyMOL y se muestra en la Figura 50.

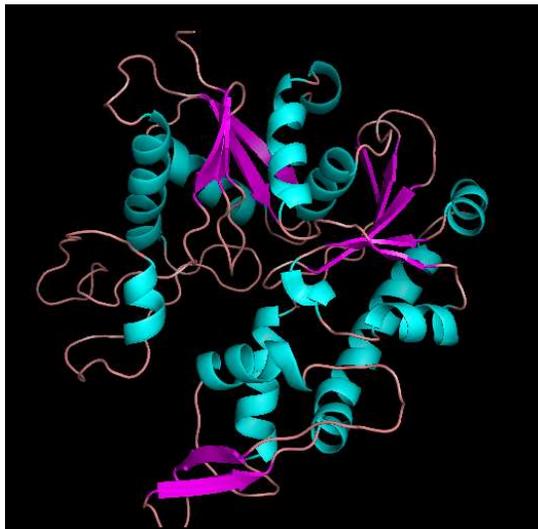


Figura 50. Modelo tridimensional de MreB de *H. pylori* 26695 generado en Geno 3D. La figura muestra la estructura secundaria del modelamiento por homología de MreB. En azul se muestran las α -hélices, en violeta las hojas β y en color rosa los bucles de la proteína.

7.4.2 Generación de interfaces de interacción entre MreB y factores de virulencia en *H. pylori* 26695.

Una vez generado el modelo tridimensional de MreB, se determinaron los probables motivos de la proteína mediante los cuales se pudiera establecer una interacción consigo misma y con los factores de virulencia UreB y VacA. Estas dos proteínas fueron seleccionadas debido a que su estructura cristalográfica había sido previamente reportada. Las interfaces de interacción obtenidas en el programa Prism 2.0 se muestran en la figura 51; mientras que los residuos de interacción entre MreB y los factores de virulencia se indican en la figura 52. Es importante mencionar que La energía libre obtenida en el análisis *in silico* fue de -24.27 kcal/mol para la interacción MreB-VacA, -15.1 kcal/mol para MreB-UreB y -51.5 kcal/mol para MreB-MreB.

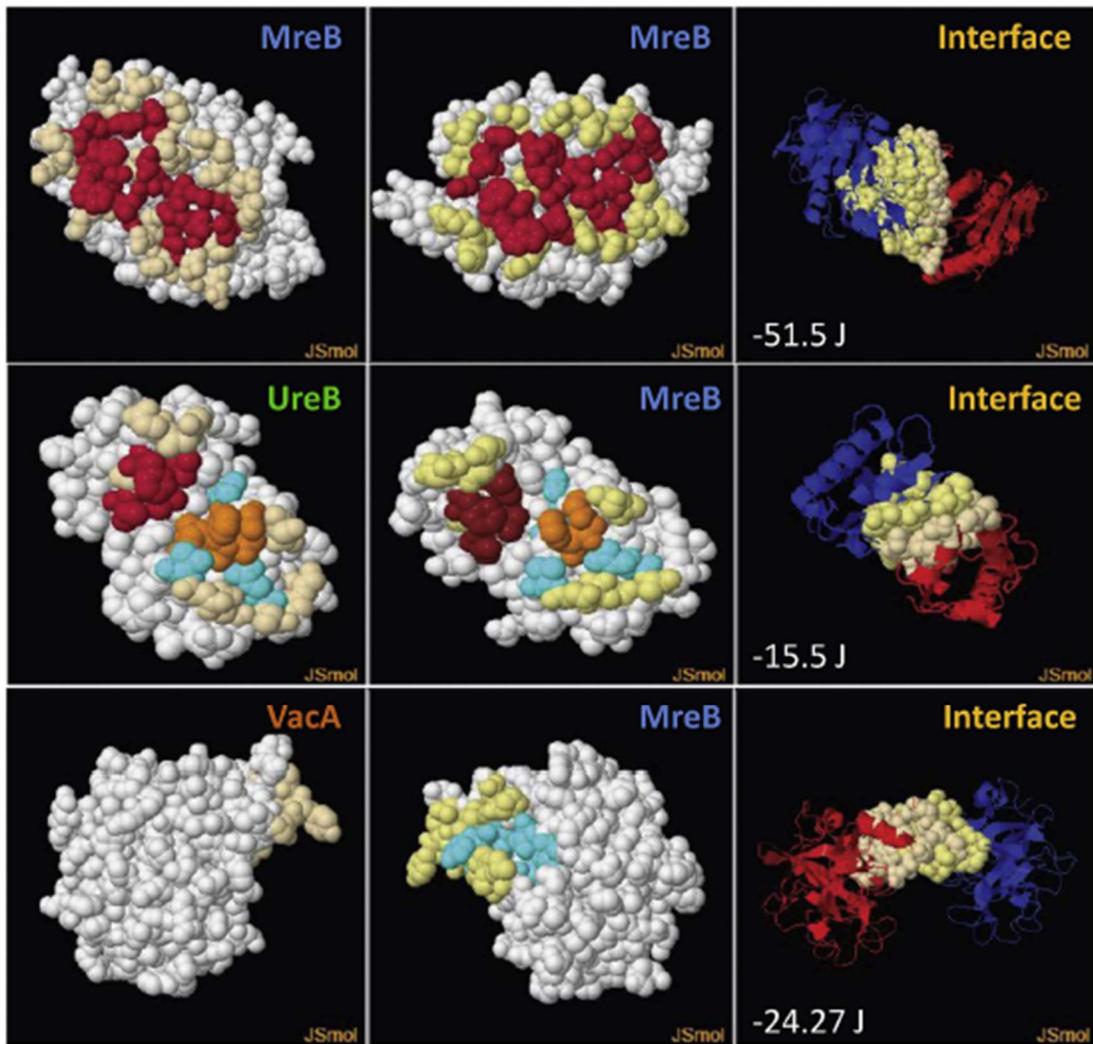


Figura 51. Interfaces de interacción de MreB generadas en Prism 2.0. La figura muestra los residuos (columna 1 y 2) y las interfaces de interacción (columna 3) de MreB-MreB, MreB-UreB y MreB-VacA. La energía libre para cada interacción es mostrada en la columna de interfaces.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| MreB-MreB | | MreB-UreB | | MreB-VacA | |
|---------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|
| pdb1_B_LEU_329 <--> | pdb2_B_ILE_176 | 1e9y_B_GLU_259 <--> | pdb1_B_SER_125 | 2qv3_A_TRP_603 <--> | pdb1_B_TYR_44 |
| pdb1_B_LEU_329 <--> | pdb2_B_LEU_174 | 1e9y_B_ILE_536 <--> | pdb1_B_GLU_121 | 2qv3_A_ARG_647 <--> | pdb1_B_LYS_83 |
| pdb1_B_LEU_329 <--> | pdb2_B_VAL_175 | 1e9y_B_PRO_540 <--> | pdb1_B_ARG_129 | 2qv3_A_VAL_694 <--> | pdb1_B_ARG_100 |
| pdb1_B_LEU_331 <--> | pdb2_B_ARG_334 | 1e9y_B_VAL_538 <--> | pdb1_B_LEU_124 | 2qv3_A_GLN_625 <--> | pdb1_B_ALA_82 |
| pdb1_B_LEU_171 <--> | pdb2_B_LYS_149 | 1e9y_B_GLU_541 <--> | pdb1_B_GLU_130 | 2qv3_A_GLN_625 <--> | pdb1_B_LYS_83 |
| pdb1_B_GLY_172 <--> | pdb2_B_LEU_171 | 1e9y_B_GLU_537 <--> | pdb1_B_LYS_120 | 2qv3_A_PHE_626 <--> | pdb1_B_ARG_86 |
| pdb1_B_LEU_329 <--> | pdb2_B_LYS_272 | 1e9y_B_GLU_537 <--> | pdb1_B_GLU_121 | 2qv3_A_ARG_552 <--> | pdb1_B_LYS_83 |
| pdb1_B_VAL_175 <--> | pdb2_B ASP_330 | 1e9y_B_GLU_537 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A_TRP_577 <--> | pdb1_B ASP_79 |
| pdb1_B_LYS_149 <--> | pdb2_B LEU_171 | 1e9y_B HIS_535 <--> | pdb1_B GLU_121 | 2qv3_A SER_553 <--> | pdb1_B LEU_38 |
| pdb1_B LEU_174 <--> | pdb2_B ASP_330 | 1e9y_B GLU_537 <--> | pdb1_B LEU_124 | 2qv3_A ARG_552 <--> | pdb1_B PHE_39 |
| pdb1_B VAL_175 <--> | pdb2_B SER_333 | 1e9y_B GLU_541 <--> | pdb1_B ARG_129 | 2qv3_A TRP_577 <--> | pdb1_B ASP_77 |
| pdb1_B LYS_149 <--> | pdb2_B LEU_171 | 1e9y_B PRO_540 <--> | pdb1_B LEU_124 | 2qv3_A SER_553 <--> | pdb1_B ASP_77 |
| pdb1_B LEU_171 <--> | pdb2_B GLY_172 | 1e9y_B ASP_548 <--> | pdb1_B VAL_114 | 2qv3_A SER_553 <--> | pdb1_B ALA_76 |
| pdb1_B ASP_330 <--> | pdb2_B LEU_174 | 1e9y_B HIS_535 <--> | pdb1_B TYR_78 | 2qv3_A ARG_552 <--> | pdb1_B ASP_79 |
| pdb1_B ASP_330 <--> | pdb2_B VAL_175 | 1e9y_B ASP_548 <--> | pdb1_B SER_113 | 2qv3_A LYS_650 <--> | pdb1_B ARG_86 |
| pdb1_B ARG_334 <--> | pdb2_B MET_138 | 1e9y_B VAL_547 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A THR_605 <--> | pdb1_B TYR_78 |
| pdb1_B LEU_174 <--> | pdb2_B LEU_171 | 1e9y_B ASP_548 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A TRP_603 <--> | pdb1_B PHE_39 |
| pdb1_B ASP_330 <--> | pdb2_B ILE_134 | 1e9y_B GLY_549 <--> | pdb1_B SER_113 | 2qv3_A TRP_603 <--> | pdb1_B LEU_38 |
| pdb1_B ARG_334 <--> | pdb2_B LEU_135 | 1e9y_B ILE_536 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A VAL_688 <--> | pdb1_B ASP_77 |
| pdb1_B LEU_174 <--> | pdb2_B LEU_133 | 1e9y_B GLY_549 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A TRP_603 <--> | pdb1_B ASP_79 |
| pdb1_B ASP_330 <--> | pdb2_B LEU_329 | 1e9y_B ILE_536 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A LYS_650 <--> | pdb1_B ALA_126 |
| pdb1_B ARG_334 <--> | pdb2_B GLY_173 | 1e9y_B ILE_536 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A LYS_650 <--> | pdb1_B GLY_127 |
| pdb1_B ARG_334 <--> | pdb2_B ASP_330 | 1e9y_B ILE_536 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A ARG_552 <--> | pdb1_B ILE_80 |
| pdb1_B LYS_272 <--> | pdb2_B LEU_174 | 1e9y_B ILE_536 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A ILE_688 <--> | pdb1_B LYS_96 |
| pdb1_B LEU_171 <--> | pdb2_B ARG_334 | 1e9y_B ILE_536 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A LYS_689 <--> | pdb1_B TRP_98 |
| pdb1_B SER_333 <--> | pdb2_B LEU_329 | 1e9y_B ILE_536 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A ILE_688 <--> | pdb1_B TRP_98 |
| pdb1_B ARG_334 <--> | pdb2_B LEU_329 | 1e9y_B ILE_536 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A GLY_604 <--> | pdb1_B ASP_79 |
| pdb1_B ILE_176 <--> | pdb2_B LEU_329 | 1e9y_B ILE_536 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A ASN_690 <--> | pdb1_B TRP_98 |
| pdb1_B VAL_175 <--> | pdb2_B LEU_329 | 1e9y_B ILE_536 <--> | pdb1_B ASN_117 | 2qv3_A THR_691 <--> | pdb1_B TRP_98 |
| pdb1_B LEU_174 <--> | pdb2_B LEU_329 | 1e9y_B GLY_549 <--> | pdb1_B ASN_117 | | |

Figura 52. Residuos de las interfaces de interacción de MreB de *H. pylori* 26695. La figura muestra los residuos de los motivos funcionales de MreB al interactuar con la misma proteína (primera columna), con UreB (segunda columna) y con VacA (tercera columna).

8. DISCUSIÓN

8.1 LETALIDAD DE LA CONSTRUCCIÓN *pJET-CF* EN *H. pylori* 26695

La transformación natural de *H. pylori* 26695 usando *pJET-CF* para la implementación de TAP a fin de identificar el complejo proteico de asociación con MreB, pudo ser posible debido a que esta bacteria (al igual que *Bacillus subtilis*, *Neisseria*, etc) posee un sistema de secreción tipo cuatro en donde el sistema ComB, puede introducir ADN foráneo e integrarlo al cromosoma (Stingl *et al.*, 2010). Sin embargo, los resultados de transformación pudieron haber sido letales para la bacteria, ya que al recombinarse el gen *mreC* que formaba parte de la construcción, pudo haber cambiado la secuencia del mismo. Lo anterior es un supuesto basado en el hecho de que, la interrupción de la expresión de *mreB* no resulta mortal para el patógeno (Waidner *et al.*, 2009); sin embargo, no ocurre lo mismo con *mreC*, ya que si la inserción del gen en el locus original afectó la expresión del mismo, también pudo haber causado la muerte del microorganismo (Lee y Stewart, 2003).

8.2 DETERMINACIÓN DEL COMPLEJO PROTEICO DE INTERACCIÓN CON MreB EN *H. pylori* 26695

8.2.1 Preferencia de uso de codones de MreB recombinante

Una vez que se reemplazó la técnica TAP por la de “pull-down” para la identificación del complejo de interacción con MreB, se sobre-expresó la misma en *E. coli Codon Plus*, debido a que en la cepa *E. coli BL21(DE3)* el gen codificante para la T7 RNA polimerasa está bajo el control del promotor *lacUV5*, lo que permite un grado insuficiente de transcripción por la preferencia estándar de uso de codones (Studier y Moffatt, 1986; Scholz *et al.*, 2013).

En la secuencia de *mreB*, se encontraron 15 codones denominados raros, ya que normalmente las cepas más comunes de *E. coli*, incluyendo *BL21(DE3)*, no hacen uso de estos codones. Particularmente, los codones raros para el aminoácido Arginina (AGG, AGA y CGA) y de los cuales se presentan 8 en *mreB*, no son de uso preferencial en cepas comunes de *E. coli* lo que puede resultar en una proteína sobre-expresada de un peso molecular menor al esperado, o bien, en una sobre-expresión cuya cantidad de proteína es insuficiente para la purificación. Por este motivo, se decidió emplear *E. coli Rosetta gami* para la sobre-expresión, ya que contiene el vector *pLacIRARE* (Figura 56 en Anexos), el cual codifica para resistencia a cloramfenicol, además de codificar para ARN de transferencia que corresponden a codones raros, entre los que se encuentran AGG/AGA/CGG para arginina, AUA para isoleucina, CUA para leucina, CCC para prolina y GGA para glicina (Novy *et al.*, 2001). Sin embargo, la sobre-expresión no se presentó en esta cepa, sino en *Codon Plus*. Una de las razones, puede ser que esta última tiende a formar mayor cantidad de biomasa. Además, *Codon Plus* contiene copias extra de los genes ARN de transferencia para arginina, isoleucina y leucina. Estos codones son problemáticos para la sobre-expresión de proteínas en organismos cuyo genoma tiene altos contenidos de AT, como es el caso de *H. pylori* (Dong *et al.*, 2014). Así mismo, la cepa *Codon Plus* contiene una ARN polimerasa T7 que permite sobre-expresar suficiente cantidad de proteína a partir de genes heterólogos, especialmente si dichos genes se encuentran clonados en vectores tales como los del tipo *pET* (Kane, 1995).

8.2.2 Plegamiento y estructuración de las proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes sobre-expresadas fueron purificadas sin hacer uso de la etiqueta GST. Dicha etiqueta fue colocada previendo una situación en donde se tuviese que purificar a partir de ella, se tuviese que realizar una segunda purificación o bien, para un proyecto a futuro. Tanto MreB como GST recombinante fueron dializadas en amortiguador de fosfatos 50 mM, a fin de reducir el imidazol con que fueron eluidas de la

columna de purificación. La concentración de imidazol después de la diálisis fue de 0.0013 mM.

Respecto al análisis de fluorescencia, se comparó el CEM de cada espectro obtenido. Al comparar los CEM de las fracciones solubles de MreB y GST y la insoluble de MreB, se observó que éste último se encontraba desplazado hacia la derecha si se comparaba con el de MreB de la fracción soluble. Lo anterior indicó que ambas proteínas, GST y MreB obtenidas de las fracciones solubles, pudieron contener sus residuos aromáticos (principalmente triptofano) sin exponerlos al solvente. Por lo tanto, el plegamiento de las mismas pudo ser adecuado y por tal motivo se usaron en el ensayo de interacción proteína-proteína. Por el contrario, la fracción insoluble de MreB aparentemente presentó los residuos aromáticos expuestos al solvente, lo que se ha reportado en proteínas con un plegamiento incorrecto (Bhattecharya *et al.*, 2014).

Por otro lado, las proteínas recombinantes se sometieron a un análisis de dicroísmo circular. Los resultados mostraron una gráfica estructurada para las fracciones solubles de las proteínas recombinantes. Este tipo de líneas graficadas se han reportado en proteínas con un buen plegamiento después de una purificación (Lopes *et al.*, 2014; Bhattecharya *et al.*, 2014). Los resultados en el análisis de fluorescencia fueron congruentes con los de dicroísmo circular, ya que los primeros sugirieron un buen plegamiento en las fracciones solubles de MreB y GST; mientras que en el dicroísmo se pudo inferir una buena estructuración en estas proteínas. Así mismo, el análisis de la estructura secundaria de las proteínas recombinantes, indicó que los porcentajes de α -hélices, hojas β y bucles de las fracciones solubles de ambas proteínas, se aproximaron a los que se predijeron en el dicroísmo circular. Los resultados anteriores sugirieron a las fracciones solubles de las proteínas recombinantes, como candidatas a ser utilizadas en el ensayo “pull-down”.

8.2.3 Complejo proteico de interacción con MreB de *H. pylori* 26695.

La estructura secundaria de MreB recombinante sugerida por difracción circular, reveló que ésta podría interactuar con varias proteínas al presentar en su composición mayor porcentaje de α -hélices (Cummings y Hamilton, 2010). Esta suposición fue respaldada por el resultado del ensayo “pull-down”, en donde se identificaron por espectrometría de masas, 86 proteínas del complejo de interacción con MreB, confirmando así una parte de la hipótesis de este trabajo en donde se propone la existencia de dicho complejo. Las proteínas fueron agrupadas con base a las funciones presentadas. Entre las proteínas del complejo, figuraron 9 factores de virulencia denominados GroEL, HydB, HylB, KatA, SpeA, ThrC, TsaA, UreB y VacA. (Marais *et al.*, 1999; Monack *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006; Schoep *et al.*, 2010; Yamaoka *et al.*, 2010), por lo que, tal como se menciona en la segunda parte de la hipótesis de este trabajo, MreB podría estar participando en la patogénesis de *H. pylori* 26695. Respecto a la chaperona GroEL y la treonina sintasa (ThrC), se ha descrito recientemente como un factores de virulencia al haberse encontrado en suero de pacientes infectados por *H. pylori*; lo que sugiere que pueden ser una proteínas que faciliten la colonización de la bacteria en el huésped (Formichella *et al.*, 2013). HydB, TsaA y KatA, representan una hidrogenasa, una alquil peróxido de hidrógeno reductasa y una catalasa, respectivamente, que permite la protección contra radicales libres en la bacteria (Yamaoka *et al.*, 2010). La hemolisina HylB es una proteína que se ha relacionado con el proceso inflamatorio del epitelio gástrico de ratones infectados con *H. pylori* (Williams *et al.*, 2007). UreB, corresponde a una de las 7 subunidades de la enzima ureasa; esencial en la colonización de la bacteria en la cavidad gástrica (Monack *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006). Sin embargo, cepas de *H. pylori* carentes de ureasa se han aislado de muestras clínicas; la razón ha sido que contienen la arginina descarboxilasa SpeA, que sustituye la actividad de la ureasa en la bacteria (Valenzuela *et al.*, 2014).

Así mismo, se compararon los resultados del ensayo “pull-down” en *H. pylori* con los obtenidos en ensayos de interacción proteína-proteína (“pull-down”o TAP) en *E. coli* (Butland *et al.*, 2005; Arifuzzaman *et al.*, 2006) y en *B. subtilis* (Kawai *et al.*, 2011). Los ensayos presentaron en común la subunidad beta de la ATP sintasa (AtpD), el factor de

elongación Tu (TufA) y la chaperona GroEL. Las proteínas compartidas por *H. pylori* y *E. coli* son el factor de elongación P (FusA), La proteína ribosomal S1 30S (RpsA), la subunidad SecA de la translocasa y la chaperona; mientras que las proteínas compartidas por *H. pylori* y *B. subtilis* fueron el factor de iniciación de la translación IF-2 (InfB), la isoleucil-ARNt sintasa (IleS), la biotina carboxilasa (AccC), la lisil-ARNt sintetasa (LysS) y la treonil-ARNt sintetasa (ThrS). Además, se observó que 8 de los 9 factores de virulencia únicamente se identificaron en *H. pylori*, ya que son propios de esa bacteria. Sin embargo, proteínas que participan en la morfología celular (PBPH, PBP1A, PBP2A, PBP4, RodA, MinD y FtsE) (Thanbichler y Shapiro, 2008) y que se encuentran codificadas en el genoma de las 3 especies bacterianas, solamente se localizaron en el ensayo para *E. coli* y *B. subtilis* y no en el de *H. pylori* 26695 (Figura 53). Este resultado comparativo, puede reafirmar el hecho de que MreB en *H. pylori* no se encuentre involucrada en el proceso de morfogénesis (Waidner *et al.*, 2009); probablemente debido a que carece de RodZ, una proteína fundamental en *E. coli* para dicha ruta (Alyahya *et al.*, 2009; Benedezu *et al.*, 2009; van den Ent *et al.*, 2010). Por otro lado, el hecho de que GroEL se haya presentado en los 3 ensayos, pese a ser considerada como un factor de virulencia en *H. pylori*, puede deberse a que actúa también como una chaperona. Hecho del que se desprende la suposición de que dicha proteína podría participar en el plegamiento de proteínas participantes en la patogénesis en *H. pylori*, siendo modulada por MreB.

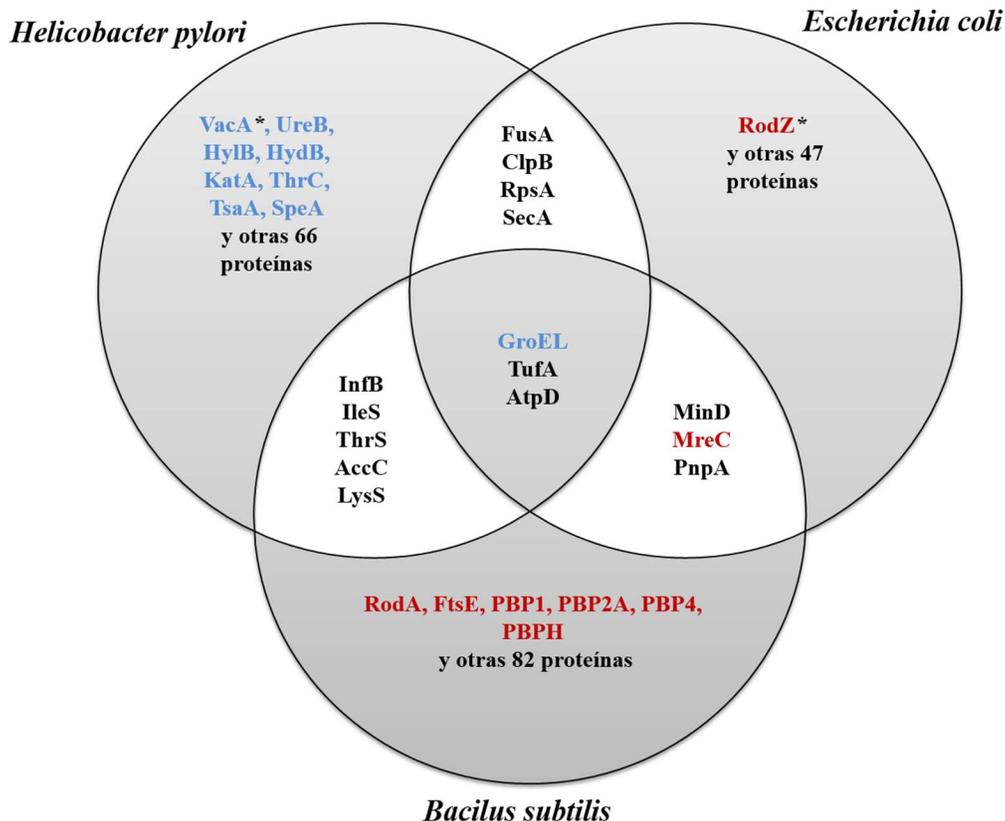


Figura 53. Esquema comparativo entre el complejo proteico de interacción con MreB en *E. coli*, *B. subtilis* y *H. pylori*. La figura esquematiza dentro de 3 círculos las proteínas que únicamente se presentaron en el ensayo “pull-down” de *H. pylori* 16695 (azul) o en el de *E. coli* y *B. subtilis* (rojo). En el ensayo para cada especie bacteriana se muestra el número de proteínas del complejo de interacción con MreB. En la intersección de los 3 círculos, se observan las proteínas que tuvieron en común los tres experimentos. Marcadas con un asterisco se encuentran las proteínas VacA y Rod Z. La primera se encuentra codificada de forma exclusiva en el genoma de *H. pylori*, mientras que la segunda en el de *E. coli* y *B. subtilis*.

De las 86 proteínas del complejo, se seleccionaron 25 por su funcionalidad para que la interacción directa con MreB fuera determinada mediante doble híbrido en bacteria. Así,

se analizaron proteínas que participan en la síntesis de ácido grasos (AccC y FabH), metabolismo de aminoácidos (HP1111 y AnsA), uso de amonio (CarB), plegamiento de proteínas (ClpB, ClpX, GroEL y HtpG), metabolismo de carbohidratos (enolasa), regulación transcripcional (regulador transcripcional de la familia Fis), replicación y reparación del ADN (GuaB, GyrB, AddA, TigF y TufA), proteólisis (PepA) y patogénesis (GroEL, HydB, HylB, KatA, SpeA, ThrC, TsaA, UreB y VacA). Además de las 25 proteínas, se utilizó en el ensayo a MreB y MreC, dando un total de 27 proteínas seleccionadas. El ensayo de doble híbrido se realizó entre dos moléculas de MreB ya que la proteína tiene la capacidad de formar homopolímeros (Waidner *et al.*, 2009; Soufo *et al.*, 2010). Por otro lado, MreC no fue identificada dentro de los resultados arrojados por espectrometría de masas, sin embargo, resultó interesante el hecho de que ambas proteínas se encuentren codificadas en un mismo operón y no hubiesen presentado interacción directa (Soufo *et al.*, 2010). Los resultados del doble híbrido indicaron que MreB presentó interacciones directas con 6 proteínas (UreB, HydB, HylB, VacA, AddA, y MreB) de las 27 seleccionadas. La actividad enzimática de β -galactosidasa fue determinada en las 6 proteínas que presentaron interacción directa con MreB, así como en MreC (pese a no haber mostrado interacción positiva) (Figura 44). De este modo, se obtuvo que la actividad de la enzima se incrementó en más de 5 veces en las interacciones de MreB con las 6 proteínas, más no en MreC.

Normalmente, cuando existe una interacción proteína-proteína directa, la actividad de β -galactosidasa tiene un rango de 700-7000 u/mg de peso seco y el testigo positivo de 6000-8000 u/mg. En este trabajo, se confirmó por doble híbrido en bacteria que no todas las proteínas del complejo identificado mediante “pull-down” mostraron una interacción directa con MreB en el sistema de *E. coli*, lo cuál puede ser explicado por el hecho de que entre estas proteínas pueden darse interacciones de forma indirecta (Figura 45). En el caso de la interacción MreB-UreB, un estudio previo respalda la interacción entre ambas proteínas. Cuando se realizó el interactoma de la ureasa en *H. pylori* 26695, se reportó que UreB podría interactuar con MreB (Stingl *et al.*, 2008). Esta interacción cobra relevancia debido a que MreB afecta la actividad de la ureasa (Waidner *et al.*, 2009). Respecto a MreC, esta proteína no fue identificada en el ensayo “pull-down”, pero fue

introducida en el experimento de doble híbrido para confirmar que, a pesar de que *mreC* se localiza en el mismo operón que *mreB*, la interacción entre ambas proteínas no se lleva a cabo. Lo anterior podría ser explicado por la localización subcelular de ambas, la cual resulta ser distante (Defeu-Soufo *et al.*, 2005). Por otro lado, la confirmación de la interacción MreB-MreB indica que, como ya se ha reportado previamente, esta proteína forma un homopolímero (Waidner *et al.*, 2009). Además, la interacción MreB-AddA se ha confirmado indispensable en cuanto a la división celular se refiere (Jones *et al.*, 2003; Amundsen *et al.*, 2008; Waidner *et al.*, 2009). Por su parte, la interacción MreB-HydB, sugiere que MreB podría tener un papel en el control de la actividad de la Hidrogenasa B, ya que, el “pull-down” mostró que también interacciona con CarB, proteína productora de la molécula carbamoil que a su vez, activa a esta hidrogenasa (Williams *et al.*, 1996). Al interactuar con HydB, MreB podría estar interfiriendo con la homeostasis estomacal, ya que se ha indicado a esta hidrogenasa como uno de los mayores determinantes en la inflamación del epitelio gástrico (Pich *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

Así mismo, se compararon los resultados de los ensayos de interacción proteína-proteína con estudios a de mayor escala (proteomas) en *H. pylori* (Rain *et al.*, 2001; Pyndiah *et al.*, 2007; Häuser *et al.*, 2014). De este modo, las proteínas hipotéticas HP0339 yHP0947, la proteína de división cromosómica ParB presentan interacción con MreB. Sin embargo, estas interacciones no ocurrieron en este trabajo; lo que puede deberse a que las interacciones en estos artículos fueron efectuadas mediante doble híbrido en levadura y no en *E. coli* como se realizó en la presente investigación. Así mismo, en este trabajo se empleó no solamente la confirmación de interacciones por doble híbrido con un testigo positivo y sus respectivos negativos, sino también la interacción MreB-MreB y MreB-MreC para indicar que el sistema funcionaba de forma adecuada. Por otro lado, es aún incierto si la solución de diálisis de MreB recombinante afectó de alguna manera la habilidad funcional de MreB; por lo que un nuevo método de detección de interacciones *in vivo* podría ser usado a futuro para respaldar los resultados aquí obtenidos.

8.2.4 Interacción *in silico* de MreB de con factores de virulencia en *H. pylori* 26695.

Para sustentar las interacciones proteína-proteína efectuadas de manera experimental, se realizó un análisis *in silico* de predicción de interfaces de interacción con MreB y 2 de los 9 factores de virulencia. Las proteínas elegidas (UreB y VacA) contenían previamente reportada su estructura cristalográfica (Ha *et al.*, 2001; Gangwer *et al.*, 2007). Así mismo, se empleó la determinación de la interface de interacción MreB-MreB, partiendo del modelo tridimensional de la proteína generado por homología. Los resultados indicaron que existían posibles motivos funcionales de interacción entre MreB-MreB y MreB y los dos factores de virulencia (Figuras 47 y 48). Además, los residuos de la posible interacción directa fueron obtenidos en cada interface generada Este análisis confirmó *in silico* y aunado a la forma experimental, que MreB podría modular la actividad de la ureasa tal y como se ha reportado previamente (Waidner *et al.*, 2009; Stingl *et al.*, 2008), además de intervenir en el proceso de patogénesis mediante la asociación directa con VacA.

9. CONCLUSIONES

La identificación del complejo proteico asociado a MreB de *H. pylori* 26695 no se efectuó mediante TAP, debido a que la construcción obtenida para la técnica pudo ser letal para la bacteria durante la transformación natural de esta última.

Mediante “pull-down” asociado a espectrometría de masas se identificó el complejo de interacción con MreB, obteniéndose un total de 86 proteínas, entre las que destacaron 9 factores de virulencia (UreB, VacA, HydB, HylB, KatA, TsaA, SpeE, GroEL y ThrC).

Se confirmó *in vitro*, mediante doble híbrido en bacteria, la interacción de MreB consigo misma y con los factores de virulencia UreB y VacA. Así mismo, se determinó que no existía interacción entre MreB y MreC, aún cuando son proteínas codificadas por genes localizados en un mismo operón.

Se generó un modelo tridimensional por homología de MreB de *H. pylori* 26695, que permitió predecir *in silico* mediante el cálculo de energía libre, los posibles motivos funcionales de las interacciones MreB-MreB, MreB-UreB y MreB-VacA.

10. RECOMENDACIONES

El ensayo “pull-down” asociado al sistema de doble híbrido bacteriano, ha resultado una técnica eficaz para la identificación de interacciones proteína-proteína. Sin embargo, no constituye un método *in vivo*, por lo que presenta limitantes. Por tanto, se propone como alternativa la co-inmunoprecipitación asociada a espectrometría de masas para identificar el complejo de interacción con MreB de *H. pylori* 26695 y respaldar las interacciones directas e indirectas aquí expuestas.

Así mismo, el conjunto de resultados obtenidos en este trabajo, representan un parteaguas en la elucidación de las funciones de MreB en *H. pylori*. Por lo que aún es necesario confirmar *in vitro*, mediante doble híbrido en bacteria, las interacciones entre las proteínas que conforman el complejo proteico identificado en este trabajo.

11. BIBLIOGRAFÍA

Akamatsu, T., Tabata, K., Hirong, M., Kawakami, H., Uyeda, M. (1996) Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. American Journal of Infection Control 24:396-401.

Akhter, Y., Ahmed, I., Devi, M., Ahmed, N. (2007) The co-evolved *Helicobacter pylori* and gastric cancer: trinity of bacterial virulence, host susceptibility and lifestyle. Infectious Agents and Cancer 2:2.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., Walter, P. (2008) Molecular Biology of the Cell. Quinta edición. Garland Science. Estados Unidos de América. 1725 p.

Alm, R. A., Ling, L., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R., Noonan, B., Guild, B. C., de Jonge, B. L., 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., Trust, T. J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 397:176-180.

Alyahya S. A., Alexander R., Costa T., Henriques A. O., Emonet T., Jacobs-Wagner C. (2009) RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. Proceeding of the National Academy of Science of U. S. A. 106(4): 1239-1244.

Amundsen, S.K., Fero, J., Hansen, L.M., Cromie, G.A., Solnick, J.V., Smith, G.R., Salama, N.R., (2008) *Helicobacter pylori* AddAB helicase-nuclease and RecA promote recombination-related DNA repair and survival during stomach colonization. Mol. Microbiol. 69 (4), 994–1007.

Ausmees, N., Kuhn, J. R., Jacobs-Wagner, C. (2003) The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. Cell 115(6): 705-13.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Axon ATR. (1995) Review Article: is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 9:585-8.

Azuma, T., Yamakawa, A., Yamazaki, S., Ohtani, M., Ito, Y., Muramatsu, A., Suto, H., Yamazaki, Y., Keida, Y., Higashi, H., Hatakeyama, M. (2004) Distinct Diversity of the *cag* Pathogenicity Island among *Helicobacter pylori* Strains in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 42(6): 422508–2517.

Basso, D.; Zambon, C. F.; Letley, D. P.; Stranges, A.; Marchet, A.; Rhead, J. L.; Schiavon, S.; Guariso, G.; Ceroti, M.; Nitti, D.; Rugge, M.; Plebani, M.; Atherton, J. C. (2008). Clinical Relevance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* Gene Polymorphisms. *Gastroenterology* 135:91–99.

Baspinar A., Cukuroglu E., Nussinov R., Keskin O., Gursoy A. (2014) PRISM: A web server and repository for prediction of protein-protein interactions and modeling their 3D complexes. *Nucl. Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gku397.

Bean, G. J., Flickinger, S. T., Westler, W. M., McCully, M. E., Sept, D., Weibel, D. B. y Amann, K. J. (2009) A22 Disrupt the Bacterial Actin Cytoskeleton by Directly Binding and Inducing a Low-Affinity State in MreB. *Biochemistry* 48(22):4852-4857.

Bendezú, F. O., de Boer, P. A. J. (2008) Conditional Lethality, Division Defects, Membrane Involution, and Endocytosis in *mre* and *mrd* Shape Mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 190(5): 1792-1810.

Bendezú, F. O., Hale, C. A., Bernhardt, T. G., de Boer P. A. J. (2009) RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *The European Molecular Biology Organization Journal* 28:293-204.

Beveridge, T. J. (2001) Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry* 76(3): 111-118.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Bhattacharya A., Prajapati R., Chatterjee S. y Mukherjee T. K. (2014) Concentration-Dependent Reversible Self-Oligomerization of Serum Albumins through Intramolecular β -Sheets Formation. *Langmuir* 30 (49): 14894–14904.

Bork, P., Sander, C., Valencia, V. (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *PNAS* 89(16): 7290-4.

Bornhorst J. A. Falke J. (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods of Enzymology* 326: 245-254.

Brückner A., polge C., Lentze N., Auerbach D. Schlattner U. (2009) Yeast two-hybrid, a powerful tool for system biology. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2763-2788.

Burland T. G. (2000) DNASTAR Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol. Biol.* 132: 71-91.

Butland, G., Peregrín-Alvarez, J. M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J., Emili, A (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* 433:531-7.

Carballido-Lopez, R. (2006) The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 888–909.

Carstens C-P. Waesche A. (1999) Codon Bias-Adjusted BL21 Derivatives for Protein Expression. *Strategies Newsletters (Stratagene)* 12(2): 49-51.

Combet, C., Jambon, M., Deléage, G. & Geourjon, C., Geno3D an automated protein modelling Web server, *Bioinformatics*, 2002, 18, 213-214.

Cummings, C.G., and Hamilton, A.D. (2010). Disrupting protein-protein interactions with

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

non-peptidic, small molecule α -helix mimetics. *Current Opinon in Chemical Biology*. 14: 341–346.

Das, J. C., Paul N. (2007) Epidemiology and Pathophysiology of *Helicobacter pylori* Infection in Children. *Indian Journals of Pediatrics* 74:287-290.

Defeu-Soufo, H. J., Graumann, P.L. (2005) *Bacillus subtilis* actin-like protein MreB influences the positioning of the replication machinery and requires membrane proteins MreC/D and other actin-like proteins for proper localization. *BMC Cell Biology* 6: 10.

Dong J., Munoz A., Kolitz S. E., Saini A. K., Chiu W. L. Rahman H., Lorsch J. R., Hinnebursch A. G. (2014) Conserved residues in yeast initiator tRNA calibrate initiation accuracy by regulating preinitiation complex stability at the start codon. *Genes & Development* 28: 502-520.

Eppinger, M., Baar, C., Raddatz, G., Huson, D. H., Schuster, S. C. (2004) Comparative Analysis of four Campylobacterales. *Nature* 2:1-15.

Farnbacher, M., Jahns, T., Willrodt, D., Daniel, R., Haas, R., Goesmann, A., Kurtz, S., Rieder, G. (2010) Sequencing, annotation, and comparative genome analysis of the gerbil-adapted *Helicobacter pylori* strain B8. *BioMed Central Genomics* 11:335.

Formichella, L., Romberg, L., Bolz, C., Vieth, M., Geppert, M., Göttner, G., Nölting, C., Walter, D., Schepp, W., Schneider, A., (2013) A novel line immunoassay based on recombinant virulence factors enables highly specific and sensitive serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical and Vaccine Immunology* 20 (11), 1703–1710.

Frixione E (2000) Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic. *Cell motility and the cytoskeleton* 46 (2): 73–94.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Gangwer, K.A., Mushrush, D.J., Stauff, D.L., Spiller, B., McClain, M.S., Cover, T.L., Lacy, D.B., (2007) Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proceeding of the National. Academy of Science of U. S. A.* 104 (41), 16293–16298.

Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. (2003) *ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis* *Nucleic Acids Research* 31:3784-3788.

Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M. D., Sly, L., McConnel, W., Harper, W. E. S. (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 39:397–405.

Günzl, A., Schimanski, B. (2009) Tandem Affinity Purification of Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 55: 19.19.1-19.19.16. doi:10.1002/0471140864.ps1919s55.

Häuser, R., Ceol, A., Rajagopala, S.V., Mosca, R., Siszler, G., Wermke, N., Sikorski, P., Schwarz, F., Schick, M., Wuchty, S., (2014) A second-generation protein–protein interaction network of *Helicobacter pylori*. *Molecular & Cellular Proteomics* 13(5): 1318–1329.

Ha, N.C., Oh, S.T., Sung, J.Y., Cha, K.A., Lee, M.H., Oh, B.H., (2001) Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Structural Biology* 8 (6), 505–509.

He, L., Zhang, L., Liu, X., Li, X., Zheng, M., Li, H., Yu, K., Chen, K., Shen, X., Jiang, H., Liu, H. (2009) Discovering Potent Inhibitors against β -Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Dehydratase (FabZ) of *Helicobacter pylori*: Structure-Based Design, Synthesis, Bioassay, and Crystal Structure Determination. *Journal of Medical Chemistry* 52: 2465-2481.

Huynh, H. Q. (2007). *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatric Infectious Diseases Revisited* 297-314.

Jones, L. J., Carballido-Lopez R., Errington, J. (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104: 913–922.

Kane, J. F. (1995) Effects of rare codons clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 5(6): 484-500.

Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., Ladant, D. A. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proceeding of the National Academy of Science of U. S. A.* 95(10): 5752-5756.

Karimova, G., Ladant, D. (2005) A bacterial two-hybrid system based on a Cyclic AMP signaling cascade. Chap. 26, pp 499-515. *Protein-Protein Interactions, A Molecular Cloning Manual 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Edited by E. Golemis. Cold Spring Harbor, New York.

Kawai, Y., M Heinz, N., Bui, N.K., Hoyland, C. N., Ogasawara, N. (2011) A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *European Molecular Biology Organization Journal* 30 (24): 4931–4941.

Kelley L. A., Mezulis S., Yates C. M., Wass M. N., Sternberg M. J. E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10: 845-858.

Khan, S.; Karim, A.; Iqbal, S. (2009). *Helicobacter* urease: Niche construction at the single molecule level. *Journal of Bioscience* 34: 503-511.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Kim, D. Y., Kim, K. K. (2003) Crystal Structure of ClpX Molecular Chaperone from *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry* 278(50): 50664-50670.

Kruse, T., Bork-Jensen, J., Gerdes, K. (2005) The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Molecular Microbiology* 55(1):78-89.

Larkin M. A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0 *Bioinformatics* 23(21): 2947–2948.

Lee, C. (2007) Coimmunoprecipitation assay. *Methods of Molecular Biology* 362: 401-406.

Lee, J. C., Stewart, G. C. (2003) Essential Nature of the *mreC* Determinant of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 15(185): 4490-4498.

Lin, Y.-F., Wu, M.-S., Chang, C.-C., Lin, S.-W., Lin, J.-T., Sun, Y.-J., Chen, D.-S., Chow, L.-P., (2006) Comparative immunoproteomics of identification and characterization of virulence factors from *Helicobacter pylori* related to gastric cancer. *Molecular & Cell Proteomics* 5(8), 1484–1496.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. E. (2000) *Molecular Cell Biology*. Quinta edición. W H Freeman and Company. 977 p.

Lopes, J. L., Miles, A. J., Withmore, L., Wallace, B. A. (2014) Distinct circular dichroism spectroscopic signatures of polyproline II and unordered secondary structure: Application in secondary structure analyses. *Protein Society* doi: 10.1002/pro.2558.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Marais, A., Mendz, G. L., Hazell, S. L., Mégraud, F. (1999) Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:642-74.

Louche, A., Salcedo, S. P., Bigot S. (2017) Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays. *Methods in Molecular Biology* 1615: 247-255.

Marshall, B. J., Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1:1311–1315.

Monack, D. M., Mueller, A., Falko, S. (2004) Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nature reviews. Microbiology* 2(9):747-65.

Mukherjee, A., Dai, K., Lutkenhaus, J. (1993) *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proceeding of the National Academy of Science of U. S. A.* 90(3): 1053-1057.

Nilsson, H. O., Aleljung, P., Nilsson, I., Tyszhiewicz, T., Wadstrom, T. (1996) Immunomagnetic bead enrichment and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in humans stools. *Journal of Microbiological Methods* 27:73-9.

Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., Mierendorf, R. (2001) Overcoming the codon bias of *E.coli* for enhanced protein expression. *inNovations* 12:1-3.

Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, Y., Narita, A. (2009) The nature of the globular-to fibrous-actin transition. *Nature* 457: 441–445.

Ogmaen, U., Keskin O., Aytuna, A. S., Nussinov, R., Gursoy, A. (2005) PRISM: Protein interaction by structural matching. *Nucleic Acids Research* 33: 331-336.

Origin (OriginLab, Northampton, MA).

Pacheco, A. R., Proença-Módena, J. L.; Sales, A. I. L., Fukuhara, Y., da Silveira, W. D., Pimenta-Módena, J. L., de Oliveira, R. B., Broc-chi, M. (2008). Involvement of *Helicobacter pylori* plasticity region and cag pathogenicity island genes in the development of gastroduodenal de-seases". European Journal of Clinical Microbiology 27: 1053-1059.

Pich, O. Q., Merrell, D. S. (2013) The ferric uptake regulator of *Helicobacter pylori*: a critical player in the battle for iron and colonization of the stomach. Future Microbiology 8:725-38.

Pogliano, J. (2008) The bacterial cytoskeleton. Elsevier 20: 19-27.

Pyndiah, S., Lasserre, J. P., Ménard, A., Claverol, S., Prouzet-Mauléon, V., Mégraud, F., Zerbib, F., Bonneu, M., (2007) Two-dimensional blue native/SDS gel electrophoresis of multiprotein complexes from *Helicobacter pylori*. Molecular & Cell Proteomics 6 (2): 193–206.

Qiao, Z., Shi-he, S., Lei-lei, C., Run-hong, M., Xiao-li, J., Su-rong, D. (2007) Type IV secretion system in *Helicobacter pylori*: a new insight into pathogenicity. Chinese medical journal 120(23):2138-2142.

Rain, J.-C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schächter, V., (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. Nature 409 (6817), 211–215.

- Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*
- Ranjan, A., Sharma, S., Banerjee, R., Sen, U., Sen, R., (2013) Structural and mechanistic basis of anti-termination of Rho-dependent transcription termination by bacteriophage P4 capsid protein Psi. *Nucleic Acids Research* 41(14): 6839–6856.
- RayChaudhuri, D., Park, J. T. (1992) *Escherichia coli* cell-division gene ftsZ encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* 359(6392): 251-254.
- Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M., Séraphin B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology* 17(10): 1030-1032.
- Romaniuk, P. J., Zoltowska, B. T. J., Trust, D. J., Lane, G. J., Olsen, N. R., Pace, D. A. (1987). *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter sp.* *Journal of Bacteriology* 169: 2137–2141.
- Schenk, P. M., Baumann, S., Mattes R., Steinbib, H-H. (1995) Improved High-Level Expression System for Eukaryotic Genes in *Escherichia coli* Using T7 RNA Polymerase and Rare ^{Arg}tRNAs. *BioTechniques* 19(2): 196-198.
- Scholz, J., Besir, H., Strasser, C., Suppmann, S. (2013) A new method to customize protein expression vectors for fast, efficient and background free parallel cloning. *BioMed Central Biotechnology* 13(12): 1-11.
- Schoep, T. D., Fulurija, A., Good, F., Lu, W., Himbeck, R. P., Schwan, C. Surface properties of *Helicobacter pylori* urease complex are essential for persistence. *Public Library of Science One* 2010; 5:e15042.
- Shaevitz, J. W., Gitai, Z. (2010) The Structure and Function of Bacterial Actins Homologs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* doi: 10.1101/cshperspect.a000364.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13(11):2498-2504.

Shiomi, D., Sakai, M., Niki, H. (2008) Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *The European Molecular Biology Organization Journal* 27(23): 3081-3091.

Soufo, H. J. D., Reimold, C., Linne, U., Knust, T., Gescher, J., Graumann, P. L. (2010) Bacterial translation elongation factor EF-Tu interacts and colocalizes with actin-like MreB protein. *Proceeding of the National Academy of Science of U. S. A.* 107:3163-8.

Stapleton, P. D., Taylor, P. W. (2002) Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science Progress* 1(85): 57-72.

Stingl, K., Müller, S., Scheidgen-Kleyboldt, G., Clausen, M., Maier, B. (2010) Composite system mediates two-steps DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *Proceeding of the National Academy of Science of U. S. A.* 107(3): 1184-1189.

Straub, F. B., Feuer, G. (1950). Adenosinetriphosphate the functional group of actin. *Biochimica et biophysica acta* 180-195.

Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189: 113-123.

Suerbaum, S., Michetti, P. (2007) *Helicobacter pylori* infection *The New England Journal of Medicine* 347:1175-1186.

Takacs, C. N., Poggio, S., Charbon, G., Pucheault, M., Vollmer, W., Jacobs-Wagner, C. (2010) MreB drives de novo rod morphogenesis in *Caulobacter crescentus* via remodeling of the cell wall. *Journal of Bacteriology* 192: 1671–1684.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Thanbichler, M., Shapiro, L. (2008) Getting organized – how bacterial cells move proteins and DNA. *Nature* 6:28-40.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

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, C., 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(6642):539-47.

Tuncbag, N., Gursoy, A., Nussinov, R., Keskin O. (2011) Predicting protein-protein interactions on a proteome scale by matching evolutionary and structural similarities at interfaces using PRISM. *Nature Protocols* 11;6(9):1341-54. doi: 10.1038/nprot.2011.367.

Valenzuela, M., Cáceres, A., Almanza, O., Bravo, D., Soto, S., Cerda, O., Toledo, H. (2014) Characterization of the Arginine Decarboxylase Gene (ORF HP0422, *speA*) Involved in Acid Tolerance in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 3(19): 182-193.

van den Ent, F., Johnson, C. M., Persons, L., de Boer, P., Löwe, J. (2010) Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ. *European Molecular Biology Organization Journal* 29(6): 1081–1090.

Vats, P., Shih, Y-L., Rothfield, L. (2009) Assembly of the MreB-associated cytoskeletal ring of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06632.x.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Von Mering, C., Krause, R., Shel, B., Cornell, M., Oliver, S. G., Fields, S., Bork, P. (2002) Comparative assessments of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature* 417(750): 399-403.

Wachi, M. y Matsuhashi, M. (1989) Negative Control of Cell Division by *mreB*, a Gene that Function in Determining the Rod Shape in *Escherichia coli* Cells. *Journal of Bacteriology* 172(6):3123-3127.

Waidner, B., Specht, M., Dempwolff, F., Haeberer, K., Schaetzle, S., Speth, V., Kist, M., Graumann, P. L. (2009) A Novel System of Cytoskeletal elements in the Human Pathogen *Helicobacter pylori*. *Public Library of Science Pathogens* 5(11): e1000669. doi:10.1371/journal.ppat.1000669.

Wakagi, T., Oshima, T., Imamura, H., Matsuzawa, H. (1998) Cloning of the gene for inorganic pyrophosphatase from a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus sp.* strain 7, and overproduction of the enzyme by coexpression of tRNA for arginine rare codón. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62(12): 2408-14.

Wallis, C. P., Filipovska, A., Rackham, O. (2018) A modified yeast three-hybrid system enabling both positive and negative selections *Biotechnolgy Letters* <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2567-7>.

Wang, G., Romero-Gallo, J., Benoit, S. L., Piazuolo, M.B., Dominguez, R. L., Morgan, D. R., Peek Jr., R.M., Maier, R.J. (2016) Hydrogen metabolism in *Helicobacter pylori* plays a role in gastric carcinogenesis through facilitating CagA translocation. *mBio* 7 (4) (pii: e01022-16).

Whitemore, L., Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analysis from circular dichroism spectroscopy data. *Nucleic Acids Research* 32: 668-673.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

Whitemore, L., Wallace, B. A. (2007) Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and References Databases. *Biopolymers* 89: 392-400.

Williams, S. M, Chen, Y-T., Andermann, T. M., Carter, J. E., McGee, D. J., Ottemann, K. M. (2010) *Helicobacter pylori* chemotaxis modulates inflammation and bacterium-gastric epithelium interactions in infected mice. *Infection and Immunity* 75:3747-57.

Wissel, M. C., Weiss, D. S. (2004) Genetic Analysis of the Cell Division Protein FtsI (PBP3): Amino Acid Substitution That Impair Septal Localization of FtsI and Recruitment of FtsN. *Journal of Bacteriology* 2(186): 490-502.

Yamaoka, Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 7:629-41.

Zarantonelli, M. L., Carlier, J. P., Alonso, J. M., Taha, M. K. (2003) Insertional inactivation of the *lpxA* gene involved in biosynthesis of lipid A in *Neisseria meningitidis* resulted in *lpxA::aph-3'* heterodiploids. *Federation of European Microbiological Society Microbiology Letters* 226: 51-56.

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/pET-19b-DNA-Novagen,EMD_BIO-69677).

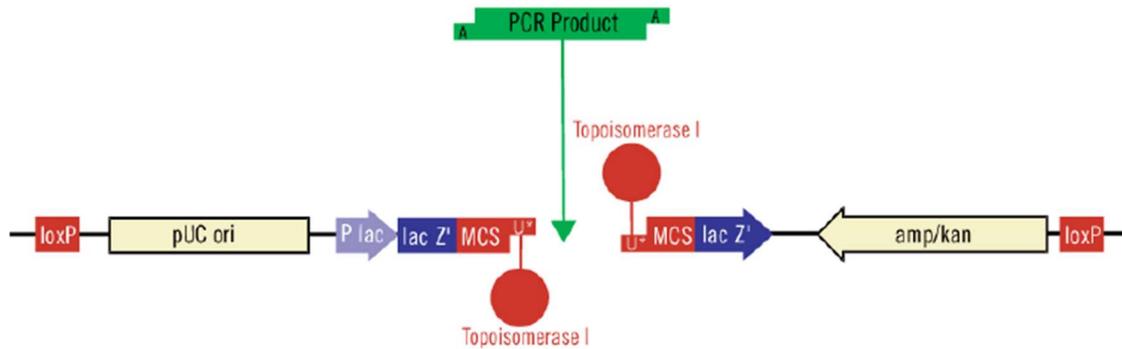


Figura 55. Clonación de *mreB* en pSCA de StrataClone®. La figura muestra la manera de inserción del producto de PCR (*mreB*). El sistema contiene 2 sitios loxP en conjunto con 2 topoisomerasas, lo que permite la clonación mediante la unión del inserto en los extremos romos del vector. La efectividad en la inserción la aseguran las topoisomerasas y la recombinasa Cre exclusiva de las células competentes del estuche comercial. Así mismo, el plásmido cuenta con el operón *lac* para identificar las células transformantes, y resistencia a ampicilina y a kanamicina.

Cuadro 10. Iniciadores diseñados en este estudio

| GEN | INICIADOR | SITIO DE CORTE |
|-------------|---|----------------|
| <i>mreB</i> | MreBF = 5'GGC CATATG ATTTTTAGCAAATTGATCGG3' | <i>NdeI</i> |
| | MreBR = 5'ATC CTCGAG TTATTCACTAAAACCCACACG3' | <i>XhoI</i> |
| | MF2H = 5'AGT CTGCAG GGATGATTTTTAGCAAATTGAT3' | <i>PstI</i> |
| | MR2H = 5'GGC GAATTC TTATTCACTAAAACCCACAC3' | <i>EcoRI</i> |
| <i>gst</i> | GSTF = 5'CGC CATATG ATGTCCCCTATACTAGGTTA3' | <i>NdeI</i> |
| | GSTR = 5'CGC CATATG ACTACGCGTGGCACCAGCTTTGAACACCAGGGAA3' | <i>NdeI</i> |
| | GSTRX = 5'ATC CTCGAG ACTACCGCGTGGCACCAGCTTTGAACACCAGGGAA3' | <i>XhoI</i> |
| <i>mreC</i> | MreCF = 5'GGC GGATCC CATGCGTTTTTATTTAAATT3' | <i>BamHI</i> |
| | MreCR = 5'TTC GAATTC TCTAGTTTTTCACATCGCTCA3' | <i>EcoRI</i> |
| <i>accC</i> | AccF = 5'GTG GGATCC GATGAATAAAGAAAATAAAAAGGT3' | <i>BamHI</i> |
| | AccR = 5'GCG GAATTC CGTTAAAAATTTCTTCTAAATACTTC3' | <i>EcoRI</i> |
| HP1111 | HP1F = 5'TCT GGATCC GATGGTAAAAGAAGTCAAAC3' | <i>BamHI</i> |
| | HP1R = 5'GCG GAATTC CGTTATACTTTAGCTTCTTCTC3' | <i>EcoRI</i> |
| <i>ansA</i> | AnsF = 5'ATT GGATCC TATGGCTCAAAATTTACCCAC3' | <i>BamHI</i> |
| | AnsR = 5'GCG GAATTC GTTCAATACTCTTCAAACATTT3' | <i>EcoRI</i> |
| <i>carB</i> | CarBF = 5'TTAG GGATCC CATGCCTAAACGCACCGATAT3' | <i>BamHI</i> |
| | CarBR = 5'GCC GAATTC TTTACTTCAAATAATCTTGTAAGGCTAAC3' | <i>EcoRI</i> |
| <i>clpB</i> | ClpBF = 5'CGC CTGCAG GATGAATTTATTTGAAAAAT3' | <i>PstI</i> |
| | ClpBR = 5'GTC GAATTC TCACTTAATCTTAGGCACAA3' | <i>EcoRI</i> |
| <i>clpX</i> | ClpXF = 5'ATT GGATCC CATGAACGAAACGCTTTATTG3' | <i>BamHI</i> |
| | ClpXR = 5'CGG GAATTC TTTAAGGAAGAATTTAGAATGCG3' | <i>EcoRI</i> |
| <i>eno</i> | EnIF = 5'GCG CTGCAG CATGCTAACCATTAAAGATAT3' | <i>PstI</i> |
| | EnIR = 5'TCAG GAATTC CGCTAGCCATGCTTAAACAAC3' | <i>EcoRI</i> |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | | |
|--------------|---|---------------|
| <i>fis</i> | FisF = 5'GTA GGATCC GATGATTAACACGATGTTTTG3' | <i>Bam</i> HI |
| | FisR = 5'GCG GAATTC GGTTAAGAAATCTTTCTAAAAC3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>groEL</i> | GroELF = 5'GG AGATCC CATGGCAAAGAAATCAAATT3' | <i>Bam</i> HI |
| | GroELR = 5'ATT GAATTC TTTACATCATGCCACCCATGC3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>guaB</i> | GuaF = 5'TAC CTGCAG GATGAGAATTTTACAAAGGGC3' | <i>Pst</i> I |
| | GuaR = 5'GCG GAATTC TGTCACCCATAATAATTAGGGG3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>gyrB</i> | GyrBF = 5'ATA CTGCAG GATGCAAATTACCAGAGCCA3' | <i>Pst</i> I |
| | GyrBR = 5'CGC GAATTC TTACACATCTAGTTGTTTCACAT3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>htpG</i> | H90F = 5'GCG GGATCC GATGTCTAATCAAGAATACAC3' | <i>Bam</i> HI |
| | H90R = 5'TAT GAATTC GCCTACAACGCTTTCAATAGCA3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>hydB</i> | HydBF = 5'CGT CTGCAG GATGTCAAAAAAATCGTAGT3' | <i>Pst</i> I |
| | HydBR = 5'CGC GAATTC TTAGAATTTAGCGAAATTAGGCT3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>hylB</i> | HylBF = 5'CTT CTGCAG GATGTTTGGGAATAAGCAGTT3' | <i>Pst</i> I |
| | HylBR = 5'CGC GAATTC TCATTCGCCTTTTTGAATTT3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>katA</i> | KatAF = 5'CCC CTGCAG GATGGTTAATAAAGATGTGAA3' | <i>Pst</i> I |
| | KatAR = 5'CGC GAATTC TTACTTTTTCTTTTTGTGTGGT3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>fabH</i> | MCAF = 5'GTA GGATCC GATGCAATACGCGCTATTATT3' | <i>Bam</i> HI |
| | MCAR = 5'GCG GAATTC GCTCACACGTATTCTTCTAAA3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>pepA</i> | PepF = 5'GCG GGATCC GATGTTAAAAATCAAATTAGA3' | <i>Bam</i> HI |
| | PepR = 5'CTTATCGATTCTCAAGCCTTTTTCAAAGCT3' | <i>Cl</i> aI |
| <i>addA</i> | AddAF = 5'GAA GGATCC CATGGATACCAAAGACAATG3' | <i>Bam</i> HI |
| | AddAR = 5'GGC GAATTC TTTCAGACCCATAATTTTCAA3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>speA</i> | SpeAF = 5'ATA GGATCC CATGCAAGAAGTCCATGATTA3' | <i>Bam</i> HI |
| | SpeAR = 5'AGG ATCGAT TTTTAAGAAATCGTGCGCAAAT3' | <i>Cl</i> aI |
| <i>thrC</i> | ThrF = 5'AA GGATCC ATGCCTTTTGCCCCAC3' | <i>Bam</i> HI |
| | ThrR = 5'GGG ATCGAT TTAATGTAGGCTTTCTAGCC3' | <i>Cl</i> aI |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | | |
|-------------|---|---------------|
| <i>tigF</i> | TigF = 5'GGT <u>GGATCC</u> CATGAATCTTGAAGTGAAAAA3' | <i>Bam</i> HI |
| | TigR = 5'GGC <u>ATCGAT</u> TTAACCCGCTTGAATTTTTT3' | <i>Clal</i> |
| <i>tsaA</i> | PXF = 5'ATA <u>CTGCAG</u> GATGTTAGTTACAAAAGTTGC3' | <i>Pst</i> I |
| | PXR = 5'GGC <u>GAATTC</u> TAAAGCTTAATGGAATTTTCTT3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>tufF</i> | TufF = 5'AAT <u>GGATCC</u> CATGGCAAAGAAAAGTTTAA3' | <i>Bam</i> HI |
| | TufR = 5'GGC <u>GAATTC</u> TTTATTCAATAATATTGCTCACAA3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>ureB</i> | UreBF = 5'GAA <u>CTGCAG</u> GATGAAAAAGATTAGCAGAAA3' | <i>Pst</i> I |
| | UreBR = 5'CGG <u>GAATTC</u> TCTAGAAAATGCTAAAGAGTT3' | <i>Eco</i> RI |
| <i>vacA</i> | VacAF = 5'ATT <u>GGATCC</u> CATGGAAATACAACAAACACA3' | <i>Bam</i> HI |
| | VacAR = 5'GGC <u>ATCGAT</u> TTAGAAACTATACCTCATTCT3' | <i>Clal</i> |
| M13 | M13F= 5' GTAAAACGACGGCCAG3' | |
| | M13R= 5' CAGGAAACAGCTATGAC3' | |
| T7 | T7F= 5'TAATACGACTCACTATAGGG3' | |
| | T7R= 5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG3' | |

Cuadro 11. Variaciones en las condiciones de amplificación de los 27 genes codificantes para las proteínas del complejo de interacción con MreB, en función de su longitud.

| Gen | Longitud (pb) | Tiempo de extensión (minutos) |
|---------------|----------------------|--------------------------------------|
| <i>tsaA</i> | 594 | 1 |
| <i>mreC</i> | 747 | 1 |
| <i>HP1111</i> | 942 | 1 |
| <i>addA</i> | 945 | 1 |
| <i>ansA</i> | 993 | 1 |
| <i>fabH</i> | 993 | 1 |
| <i>mreB</i> | 1044 | 1.5 |
| <i>tufA</i> | 1200 | 1.5 |
| <i>eno</i> | 1281 | 1.5 |
| <i>hylB</i> | 1302 | 1.5 |
| <i>clpX</i> | 1341 | 1.5 |
| <i>tigF</i> | 1356 | 1.5 |
| <i>accC</i> | 1368 | 1.5 |
| <i>guaB</i> | 1446 | 1.5 |
| <i>thrC</i> | 1458 | 1.5 |
| <i>pepA</i> | 1491 | 1.5 |
| <i>katA</i> | 1518 | 1.5 |
| <i>fis</i> | 1521 | 1.5 |
| <i>groEL</i> | 1641 | 2 |
| <i>ureB</i> | 1710 | 2 |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

| | | |
|-------------|------|---|
| <i>hydB</i> | 1737 | 2 |
| <i>speA</i> | 1848 | 2 |
| <i>htpG</i> | 1866 | 2 |
| <i>gyrB</i> | 2322 | 3 |
| <i>clpB</i> | 2571 | 3 |
| <i>carB</i> | 3258 | 3 |
| <i>vacA</i> | 3873 | 3 |

* La Tm empleada en la amplificación de la totalidad de los genes fue de 60 °C.

Cuadro 12. Condiciones de cultivo y uso de las cepas empleadas.

| Cepa | Uso | Temperatura de crecimiento (°C) | Necesidades de oxígeno | Medio de cultivo |
|--------------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------------|------------------|
| <i>Helicobacter pylori</i> 26695 | Transformación natural y obtención de ADN genómico | 37 | microaerofílica (10%CO ₂) | agar sangre |
| <i>Escherichia coli</i> DH5α | Clonación | 37 | aerofílica | LB |
| <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) | Sobre-expresión | 37 | aerofílica | LB |
| <i>Escherichia coli</i> Rosetta gami | Sobre-expresión | 37 | aerofílica | LB |
| <i>Escherichia coli</i> CodonPlus | Sobre-expresión | 37 | aerofílica | LB |
| <i>Escherichia coli</i> BTH101 | Doble híbrido en bacteria | 30 y 37 | aerofílica | LB |

Análisis del complejo proteico asociado a la proteína homóloga de actina (MreB) en *Helicobacter pylori*

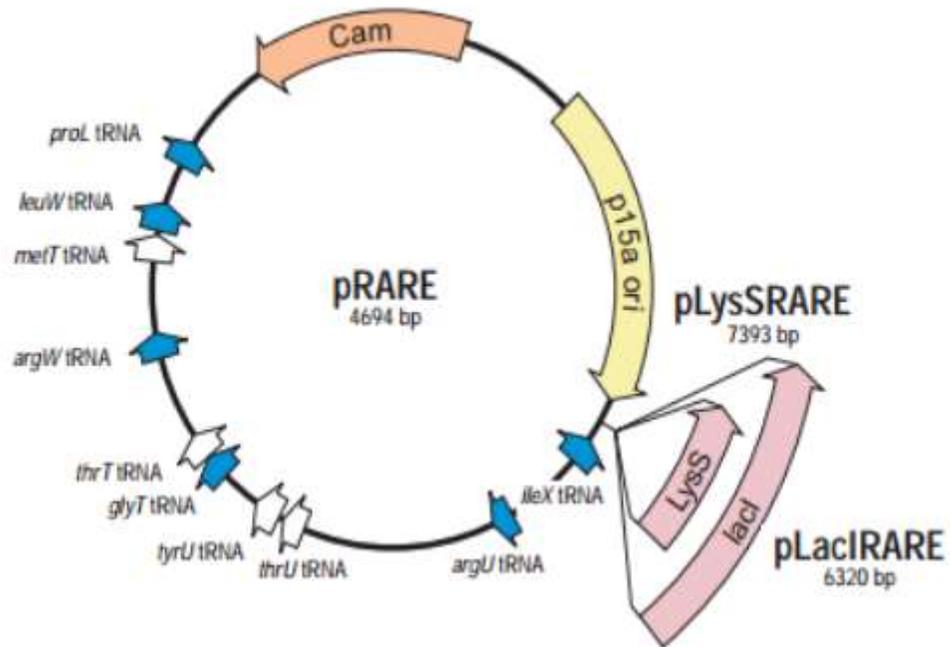


Figura 56. Vector *pLacIRARE* de *E. coli Rosetta gami*. El plásmido codifica para resistencia a cloramfenicol, así como para 10 ARN de transferencia correspondientes a codones raros.

La información presentada en este trabajo se encuentra publicada en:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.008>