

## ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

## Análisis *in silico* de proteínas potencialmente involucradas en la biogénesis de fimbrias en *Helicobacter pylori*

### *In silico analysis of proteins potentially involved in fimbrial biogenesis in Helicobacter pylori*

Nancy Karina Arteaga-Resendiz,<sup>1,2</sup> Norma Velázquez-Guadarrama,<sup>2</sup> Sandra Rivera-Gutiérrez,<sup>1</sup> José de Jesús Olivares-Trejo,<sup>3</sup> Alfonso Méndez-Tenorio,<sup>1</sup> Pedro Valencia-Mayoral,<sup>2</sup> Edgar Oliver López-Villegas,<sup>1</sup> Alejandra Rodríguez-Leviz,<sup>2</sup> Juan Carlos Viguera,<sup>2</sup> José Arellano-Galindo,<sup>2</sup> Jorge Girón,<sup>3</sup> Javier Torres-López<sup>4</sup>

#### RESUMEN

**Introducción.** La colonización e infección crónica por *Helicobacter pylori* es el factor de mayor contribución al desarrollo de cáncer gástrico. Se ha descrito un gran repertorio de adhesinas que contribuyen a la adaptación específica de la bacteria al nicho gástrico y, para *H. pylori*, al igual que en otras bacterias patógenas, la formación de biopelícula es fundamental en la supervivencia a ambientes no favorables. Las fimbrias o pili tipo IV son responsables de la adhesión de diversas bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*) a distintas superficies. El objetivo de este trabajo fue identificar y analizar genes que pudieran codificar para proteínas involucradas en la biogénesis de fimbrias en *H. pylori* y caracterizar su expresión durante la formación de biopelícula.

**Métodos.** Se emplearon herramientas bioinformáticas y moleculares, tales como la base de datos del NCBI para la búsqueda de secuencias de proteínas relacionadas con la biogénesis de fimbrias, así como la herramienta de PSI BLAST. Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa T-COFFEE y HMMER. La predicción de las estructuras secundarias se realizó con ANTHEPROT y las estructuras terciarias se predijeron con el programa I-TASSER.

**Resultados.** Se identificaron dos homólogos, jhp0257 y HP0272, de la proteína PilN de *Campylobacter rectus* y *Xilella fastidiosa*, la cual es parte de la maquinaria del ensamble de la fimbria tipo IV. Asimismo, las proteínas jhp0887 y HP0953 presentaron homología a nivel del péptido señal de PilA de *P. aeruginosa*, y la proteína HP0953 se sobreexpresó durante la formación de la biopelícula.

**Conclusiones.** *H. pylori* posee proteínas homólogas a las proteínas de familias fimbriales, específicamente PilN y PilA, que

#### ABSTRACT

**Background.** Colonization and chronic infection with *Helicobacter pylori* is the major contributing factor to the development of gastric cancer. A large repertoire of adhesins has been described that contribute to the adaptation of bacteria to a specific gastric niche. As in other pathogenic bacteria, *H. pylori* biofilm formation is central to survival on unfavorable environments. Type IV pili or fimbriae are responsible for the adhesion of many pathogenic bacteria (e.g., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae*) to various surfaces. The aim of this study was to identify and analyze genes that might encode proteins involved in the biogenesis of fimbriae on *H. pylori* and characterize their expression during biofilm formation.

**Methods.** PSI BLAST, bioinformatics and molecular tools were used as well as the NCBI database search for sequences related to protein biogenesis of fimbriae. Multiple alignments were performed using the HMMer and T-COFFEE programs. The secondary structure prediction was performed with ANTHEPROT and the tertiary structures were predicted with the I-Tasser.

**Results.** We identified two counterparts—jhp0257 and HP0272—from protein of *Campylobacter rectus* and PilN *Xilella fastidiosa*, which is part of the machinery of assembly type IV fimbria. Similarly, proteins jhp0887 and HP0953 show homology from peptide PilA level of *P. aeruginosa*, and the HP0953 protein is overexpressed during the formation of the biofilm.

**Conclusions.** *H. pylori* possesses proteins homologous to fimbrial protein families, specifically PilN and PilA, which join type IV

<sup>1</sup> Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

<sup>2</sup> Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Infectología, Hospital Infantil de México Federico Gómez

<sup>3</sup> Instituto de Patógenos Emergentes, Universidad de Florida

<sup>4</sup> Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social

México, D.F., México

Fecha de recepción: 05-02-13

Fecha de aceptación: 05-03-13

ensamblan fimbria tipo IV en otras bacterias. Esta última tiene un nivel de expresión mayor durante la etapa inicial del proceso de formación de biopelícula.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, fimbria tipo IV, pilina, biopelícula.

## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es una bacteria pleomórfica Gram negativa<sup>1</sup> que coloniza de manera crónica el epitelio gástrico e infecta a la mitad de la población mundial.<sup>2</sup> Su prevalencia es mayor en los países en vías de desarrollo, donde la infección se asocia con el nivel sociocultural y económico de la población.<sup>3</sup>

*H. pylori* es considerado un miembro prominente de la microbiota humana y ha acompañado al *Homo sapiens* durante la historia. Este microorganismo se adquiere durante la niñez y se transmite dentro del ambiente familiar.<sup>4</sup> La mayoría de los individuos infectados son asintomáticos. Sin embargo, de 10 a 20% pueden desarrollar gastritis atrófica o úlcera péptica y, alrededor de 1 a 3%, cáncer gástrico. *H. pylori* se clasificó como carcinógeno de tipo I<sup>5</sup> y se estima que 5.5% del total de casos de cáncer en el mundo y más de 60% de casos de cáncer gástrico son causados por este microorganismo.<sup>4</sup>

*H. pylori* está asociado con infecciones extra digestivas, como los desórdenes en la función vascular (migraña primaria y fenómeno de Raynaud primario), la enfermedad isquémica del corazón y el síndrome cardíaco.<sup>6</sup> Generalmente, la enfermedad no se desarrolla durante la niñez, sino en la edad adulta, después de décadas de infección.<sup>7</sup>

El proceso de colonización por *H. pylori* se compone de cuatro pasos: (i) la transmisión a un nuevo huésped; (ii) la adhesión de la bacteria a un nicho específico dentro del huésped; (iii) la prevención, la subversión o la explotación de los mecanismos de defensa del huésped; y (iv) la adquisición de nutrientes, que resulta en la multiplicación exitosa de la bacteria.<sup>8</sup>

*H. pylori* puede estar presente en los sistemas de distribución de agua —en la superficie de pozos subterráneos, ríos y en sistemas de aguas residuales—, lo que permite considerar la posibilidad de que exista como biopelícula en superficies expuestas al agua. Esto provee otra ruta de infección al humano, ya que no se conocen reservorios animales.<sup>9</sup> Otra posibilidad de infección por *H. pylori* es por vía orofecal o iatrogénica, durante colecta de biopsias a través del endoscopio o el uso de pinzas contaminadas.<sup>10</sup>

fimbriae in other bacteria. The latter has a higher expression level during the initial stage of the formation of biofilm.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, type IV fimbriae, pilin, biofilm.

La formación de biopelículas es crítica, no solo para la supervivencia del microorganismo en ambientes no favorables, sino también para la infección exitosa de numerosas bacterias patógenas.<sup>11</sup> Se ha documentado que las fimbrias son importantes para la formación de biopelículas para *Salmonella enteritidis*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *E. coli*. Estas estructuras proteicas reconocen una amplia gama de blancos moleculares, permitiendo que la bacteria interactúe con diversas superficies y se una a tejidos específicos en el hospedero.<sup>12</sup> Las fimbrias tipo IV son apéndices filamentosos, flexibles y multifuncionales que poseen propiedades de virulencia, como adhesión, movimiento contráctil, agregación, transferencia horizontal de genes, desarrollo multicelular y formación de biopelículas.<sup>13,14</sup>

La fibra del pilus consiste, principalmente, de miles de subunidades de pilina polimerizadas en la superficie bacteriana (PilE en *Neisseria meningitidis* y PilA en *Pseudomonas aeruginosa*).<sup>14</sup> Existen dos tipos de fimbria tipo IV, el IVa y IVb. Las proteínas asociadas con la biogénesis de la fimbria tipo IVb son más diversas que las asociadas a la fimbria tipo IVa. Algunas de las proteínas que tienen en común ambos tipos de fimbrias son PilA, la ATPasa PilF, la secretina de membrana externa PilQ y la ATPasa PilT. Los genes *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilP* y *pilQ* se encuentran consecutivamente en el cromosoma, lo cual parece estar específicamente asociado con la biogénesis de la fimbria tipo IVa.<sup>15</sup>

En los últimos años, las herramientas bioinformáticas han permitido analizar con mayor eficiencia un gran número de proteínas de las que aún se desconoce su función en muchos organismos, incluyendo *H. pylori*. El objetivo de este estudio fue identificar en el genoma de *H. pylori* genes que codifican proteínas hipotéticas, homólogas a las proteínas asociadas con la biogénesis de fimbrias mediante herramientas bioinformáticas y analizar su expresión durante la formación de biopelícula.

## MÉTODOS

### Cepas y condiciones de cultivo

Se emplearon las cepas de referencia de *H. pylori* 26695 y J99. La primera, proveniente de un paciente de Reino

Unido con gastritis y la segunda, de una paciente de Estados Unidos con úlcera duodenal. Se cultivaron en agar Casman adicionado con 5% de eritrocitos de carnero. Se incubaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

### **Análisis *in silico* para la búsqueda de genes asociados a la biogénesis de fimbrias en *H. pylori***

Las secuencias de las proteínas asociadas a la biogénesis de fimbrias en bacterias Gram negativas se obtuvieron de la base de datos ENTREZ del NCBI (Centro Nacional de Información en Biotecnología).<sup>16</sup> Estas secuencias se compararon con el proteoma de *H. pylori* 26695 mediante los programas PSI BLAST<sup>17</sup> y HMMER<sup>18,19</sup> para identificar secuencias homólogas de distintas bacterias. El programa T-COFFEE<sup>20,21</sup> se empleó para realizar los alineamientos múltiples de las secuencias identificadas. Asimismo, el programa ANTHEPROT<sup>22,23</sup> fue utilizado para predecir estructuras secundarias y las propiedades de hidrofobicidad, hidrofiliidad, antigenicidad y dominios transmembranales. Finalmente, las estructuras tridimensionales de las proteínas identificadas se modelaron por el método *ab-initio*, empleando el programa I-TASSER.<sup>24,25</sup>

### **Producción de biopelícula analizada por el método de retención del cristal violeta**

En una placa de 96 pozos se colocaron 200 µL de caldo Brucella (BBL, Franklin Lakes, NJ) suplementado con 1% de extracto de levadura (DIBICO, México, D.F.) más un inóculo (6 x 10<sup>8</sup> células/mL) de *H. pylori* J99 y 26695 en cada pozo. Se realizaron ocho repeticiones y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> por 1, 3, 6, 9, 24 y 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante y se lavaron los pozos con PBS 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo). Se adicionó glutaraldehído (Sigma-Aldrich) al 2.5% para fijar las células y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se eliminó el glutaraldehído, se lavó con PBS 1X (Sigma-Aldrich) y se tiñó con cristal violeta (HYCEL, México, D.F.) al 0.5% durante 10 minutos. Finalmente se lavó dos veces con PBS 1X, se dejó secar al aire libre y se agregaron 200 µL de alcohol-acetona 80:20 (HYCEL) para recuperar el cristal violeta absorbido por las biopelículas. Por último, se leyó la absorbancia del cristal violeta retenido por las células adheridas, en un lector de ELISA a 540 nm usando como blanco alcohol-acetona (Labsystems, Multiskan Ascent, Haverhill, MA).

### **Expresión de los genes asociados a fimbrias**

A partir de las proteínas identificadas en el análisis *in silico*, se obtuvieron las secuencias que las codifican y se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los genes. Se empleó el programa Primer3.<sup>26</sup> Además, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen *flhF*, que codifica para una proteína reguladora de la biosíntesis del flagelo; el gen *glmM*, que es un gen constitutivo que codifica para la fosfoglucosamina mutasa; y el gen *hp0015* homólogo a *virB2*, que codifica para una proteína que constituye el pelo del sistema de secreción tipo IV.

### **Extracción de ARN de *H. pylori***

El ARN se extrajo a partir del crecimiento de 48 horas de *H. pylori* cepa 26695. Este se resuspendió en 50 ml de caldo Brucella suplementado con 1% de extracto de levadura a pH 6, a una concentración equivalente al tubo 2 de McFarland (1x10<sup>8</sup> UFC/ml). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 1, 3, 6, 24 y 48 horas. El mismo experimento se realizó empleando el mismo medio a pH 4 y los mismos tiempos de incubación, y en cultivo de células de AGS (ATCC CRL-1739), con 80 a 100% de confluencia en medio F12 (GIBCO, Invitrogen, Grand Island, N.Y.). Este último ensayo se incubó por 1 y 3 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. De cada botella se eliminó la suspensión bacteriana que no se adhirió a la superficie, se raspó la superficie de las botellas con un gendarme y 1 ml de PBS 1X estéril para obtener las bacterias y células adheridas en el caso del cultivo celular infectadas con la cepa de *H. pylori*. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 2 min, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 100 µl de SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA) al 1% y 800 µl de TRIzol (Invitrogen) para extraer el ARN. Todas las muestras se conservaron a -70°C.

Se agregaron 200 µl de cloroformo (Baker, Xalostoc, México), se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 3 min, y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. A la fase acuosa se adicionaron 350 µl de isopropanol (AMRESCO, Solon, Ohio), se mezcló suavemente e incubó a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón se lavó con 1 ml de etanol (AMRESCO) al 70%, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y el botón se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de agua libre de nucleasas. El ARN obtenido se cuantificó y se sometió a

electroforesis en gel de agarosa (Promega, Madison, WI) al 1% teñido con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Finalmente se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .<sup>27</sup>

### Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Las muestras de ARN se trataron previamente con DNasa I (Promega) para eliminar el ADN residual y la síntesis del cADN se realizó siguiendo el protocolo de la marca comercial de la SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Se realizó una mezcla de reacción que contenía 1,500 ng de ARN, 1  $\mu\text{l}$  de dNTP (10 mM), 1  $\mu\text{l}$  de *random hexamers* (50 ng/ $\mu\text{l}$ ) y agua libre de nucleasas hasta 10  $\mu\text{l}$ . La reacción se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 min y después a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Además, se preparó otra mezcla con 2  $\mu\text{l}$  de Regulador 10X RT, 4  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 2  $\mu\text{l}$  de DTT 0.1 mM y 1  $\mu\text{l}$  RNaseOUT™ 40 U/ $\mu\text{l}$ . Los 9  $\mu\text{l}$  de la segunda reacción se agregaron a la primera reacción y se incubó a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 2 min. Posteriormente se adicionó 1  $\mu\text{l}$  de SuperScript™ II RT y se incubó a  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 min,  $42^{\circ}\text{C}$  por 50 min,  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 min, y  $4^{\circ}\text{C}$  por 3 min. Finalmente se agregó 1  $\mu\text{l}$  de RNasa H y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 20 min. El cADN obtenido se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta 72 horas.

La mezcla de reacción para la PCR contenía 1.5  $\mu\text{l}$  de cADN 120 ng/ $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}$  de cada oligonucleótido 10 pmol/ $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$  de Go Taq® Green Master Mix (Promega) (Taq DNA polimerasa, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dGTP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dTTP, 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ ) y 1.5  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas. El programa de amplificación para los genes *glmM* y *flhF* fue de un ciclo de desnaturalización inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 min y 24 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 min,  $65^{\circ}\text{C}$  por 1 min para alineación, y para los genes *hp0015* y *00953* fue un ciclo de desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 min y 26 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 min y  $68.4^{\circ}\text{C}$ . La extensión de ambos fue a  $65^{\circ}\text{C}$  por 1 min y un ciclo de extensión final a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 7 min. Posteriormente, 5  $\mu\text{l}$  del producto de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa a 1% teñido con bromuro de etidio (100 V, 50 mA por 40 min). El gel se observó bajo luz ultravioleta.

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados en medias y desviación estándar. En el análisis estadístico se empleó la t de Student con valor de significación  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Análisis *in silico* para la búsqueda de genes asociados a la biogénesis de fimbrias en *H. pylori*

Se compararon las secuencias de las proteínas que conforman a los diferentes tipos de fimbrias, tales como fimbria tipo P, tipo I y tipo curli con el proteoma del género *Helicobacter*, sin obtener resultados significativos. Por otra parte, usando la base de datos de la NCBI, se buscaron proteínas posiblemente asociadas con la biogénesis de fimbrias en el género *Helicobacter*, y se identificaron dos proteínas hipotéticas de *H. winthamensis* y *H. acinonychis*. La secuencia de la proteína con número de acceso ZP\_0453914 de *H. winthamensis* se comparó con el proteoma de diferentes especies de *Helicobacter*, utilizando el programa HMMER,<sup>19</sup> pero no se obtuvieron resultados significativos. La secuencia de la proteína con número de acceso CAJ99352 de *H. acinonychis* se comparó de la misma forma. Se encontraron dos proteínas con valor de expectación de 0.05 para jhp0257 y HP0272, una perteneciente a *H. pylori* J99 y la otra a *H. pylori* 26695, respectivamente.

La secuencia de la proteína jhp0257 se sometió a un análisis con PSI BLAST<sup>17</sup> para buscar homólogos remotos de la misma, y se encontró que la proteína era homóloga de PilN, una proteína que ensambla la fimbria tipo IV en diferentes bacterias. Se obtuvieron resultados similares con la proteína HP0272.

Las proteínas homólogas más cercanas fueron para la proteína PilN de *Campylobacter rectus*, con número de acceso ZP\_03611073, y la proteína de ensamble fimbrial de *Xylella fastidiosa*, con número de acceso ZP\_00652831. Estas secuencias y las de *H. pylori* fueron alineadas mediante el programa T-COFFEE.<sup>21</sup> En el alineamiento se muestran zonas altamente variables y únicamente un área pequeña conservada, marcada en rojo (Figura 1a).

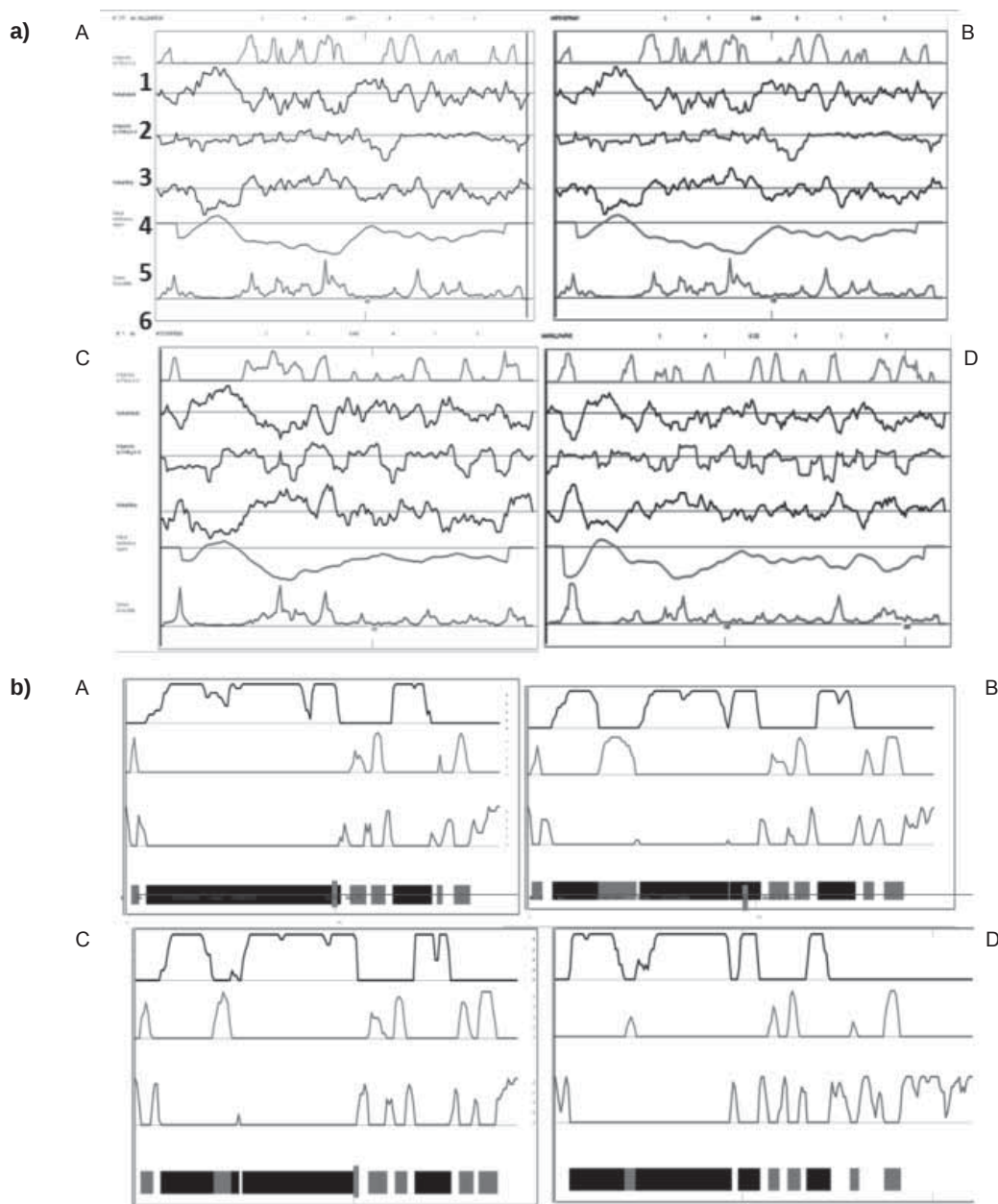
Las proteínas PilN de *C. rectus* y *X. fastidiosa* se obtuvieron durante la primera iteración del análisis, por lo que se utilizaron en la comparación de las predicciones de las propiedades biológicas de las proteínas jhp0257 y HP0272, las cuales fueron obtenidas con el programa ANTHEROT.<sup>23</sup> Las gráficas muestran un patrón similar en las propiedades de hidrofobicidad, hidrofiliidad, antigenicidad y dominios transmembranales (Figura 2a).

Asimismo, se realizó la predicción de la estructura secundaria de las cuatro proteínas mediante el programa ANTHEROT. Se muestra gran similitud entre



las gráficas, lo cual indica que las proteínas jhp0257 y HP0272 poseen estructuras secundarias muy parecidas a las de las proteínas PilN de *X. fastidiosa* y *C. rectus* (Figura 2b).

Por otro lado, utilizando como referencia el precursor de la proteína fimbrial tipo IV de *P. aeruginosa* (con número NP\_253215 de la base de datos del NCBI<sup>16</sup>), se encontraron dos dominios conservados: uno, relacionado



**Figura 2.** Predicción de propiedades biológicas y estructura secundaria de proteínas. **a)** Predicción de propiedades biológicas de las proteínas. A) jhp0257 de *H. pylori* J99. B) HP0272 de *H. pylori* 26695. C) Proteína de ensamble fimbrial (PilN) de *C. rectus*. D) Proteína de ensamble fimbrial de *X. fastidiosa*. 1) Antigenicidad de Parker. 2) Hidrofobicidad. 3) Antigenicidad de Welling. 4) Hidrofilicidad. 5) Regiones transmembranales. 6) Accesibilidad al solvente. **b)** Predicción de la estructura secundaria de proteínas. A) jhp0257 de *H. pylori* J99. B) HP0272 de *H. pylori* 26695. C) Proteína de ensamble fimbrial (PilN) de *C. rectus*. D) Proteína de ensamble fimbrial de *X. fastidiosa*. 1) Alfa hélice. 2) Láminas beta plegadas. 3) Coil.

con la superfamilia de las pilinas, con referencia PF00114 de la base de datos Pfam, y el otro concerniente a la familia de pilinas para el ensamble del pilus Tfp de diferentes bacterias, con acceso COG4969. Se analizaron los alineamientos de las secuencias de proteínas que conforman ambas familias y se crearon modelos ocultos de Markov utilizando el programa HMMER.<sup>19</sup> Posteriormente, estos se compararon con el grupo de proteomas de las diferentes especies de *H. pylori*, obteniéndose tres proteínas similares a las de la superfamilia de pilinas (Pfam); sin embargo, tienen valores de expectación mayores de 0.05.

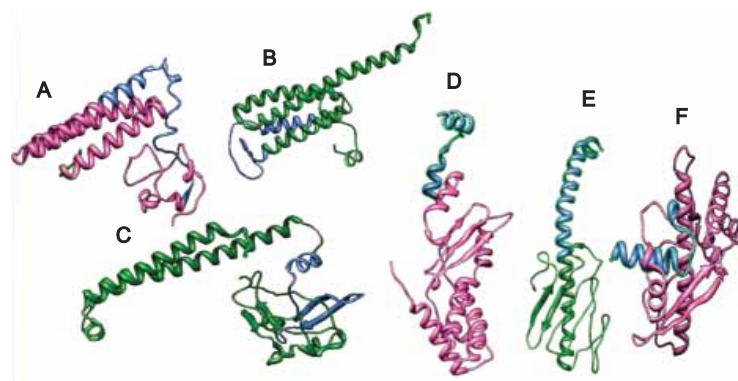
Por su parte, al comparar la subunidad mayor (PilA) de la familia de pilinas, se encontraron tres proteínas. Una de ellas corresponde a la misma encontrada durante el análisis con la superfamilia de pilinas (Pfam). Al igual que el análisis anterior, estas últimas proteínas tampoco son estadísticamente significativas, ya que el valor de expectación fue mayor de 0.05. Las proteínas encontradas pertenecen a *H. mustelae*, *H. pylori* P12, *H. pylori* G27, *H. hepaticus* y *H. felis*.

La proteína de *H. mustelae*, con número de acceso YP\_003517399 de la base de datos del NCBI,<sup>16</sup> posee secuencias similares a las pilinas de la superfamilia de pilinas y a la familia de pilinas para el ensamble del pilus Tfp, por lo que la secuencia de esta proteína fue utilizada para realizar una búsqueda de homólogos remotos mediante la herramienta PSI BLAST del NCBI.<sup>17</sup> Se encontró que esta proteína también posee el dominio conservado de la familia de pilinas A (PilA) y tiene gran similitud con la proteína PilA de otras bacterias. Asimismo, se encontraron

proteínas de diferentes especies de *Helicobacter* que son homólogas a las de *H. mustelae*, incluyendo las proteínas de *H. pylori* que fueron similares a la superfamilia de pilinas. Principalmente se consideraron las proteínas jhp0887 y HP0953, pertenecientes a las cepas de referencia *H. pylori* J99 y 26695, respectivamente.

Mediante el servidor de T-COFFEE,<sup>21</sup> se realizó un alineamiento múltiple de varias proteínas PilA tomadas al azar que pertenecían a diferentes bacterias, y se observó que existía una pequeña zona conservada, marcada en rojo, al principio de las secuencias; el resto era muy variable. De la misma manera, se realizó un alineamiento múltiple entre las mismas proteínas de diferentes bacterias y las proteínas obtenidas de diferentes especies de *Helicobacter*, incluyendo *H. mustelae* y *H. pylori*, las cuales mostraron un comportamiento similar al anterior (Figura 1b).

Utilizando el programa I-TASSER se realizó el modelaje en tercera dimensión de las proteínas obtenidas. Se observó que las proteínas PilN y las proteínas hipotéticas de *H. pylori* (jhp0257 y HP0272) tienen una gran semejanza, principalmente por  $\alpha$  hélices (Figura 3). Por su parte, la estructura tridimensional de la pilina tipo IV de *P. aeruginosa* PilA presenta un carboxilo terminal (C-terminal) de 122 residuos que se pliega de diferentes formas, y el amino terminal (N-terminal) es un  $\alpha$  hélice rodeada por un conjunto de cuatro láminas  $\beta$  plegadas antiparalelas y termina en  $\alpha$  hélices. A pesar de que son diferentes las estructuras de las proteínas hipotéticas de *H. pylori* J99 y 26695 con las del modelo de PilA, el modelo de jhp0887 muestra un  $\alpha$  hélice en el N-terminal, donde se localiza el



**Figura 3.** Predicción de estructura tridimensional de proteínas. **A)** Proteína hipotética jhp0257 de *H. pylori* J99. **B)** Proteína de ensamble fimbrial PilN de *C. rectus*. **C)** Proteína de ensamble fimbrial de *X. fastidiosa*. En azul se resalta la zona más conservada en el alineamiento múltiple de las secuencias. Las tres proteínas presentan una región de alfa hélices que se disponen de forma parecida. **D)** Proteína hipotética jhp0887 de *H. pylori* J99. **E)** Precursor fimbrial tipo IV PilA de *P. aeruginosa*. **F)** Proteína hipotética HP0953 de *H. pylori* 26695. En azul se resalta la zona más conservada en el alineamiento múltiple de las secuencias. Se observa que la región conservada presenta una forma de alfa hélice en ambas proteínas.

péptido señal (Figura 3, color azul). Asimismo, la estructura terciaria de la proteína HP0953 presenta una  $\alpha$  hélice rodeada por  $\beta$  plegadas similar a PilA además de otras  $\alpha$  hélices.

### Producción de biopelícula

La cepa 26696 aumentó 10 veces la producción de biopelícula. Es decir, de una densidad óptica de 0.351 a 3 horas a 540 nm, aumentó a 3.673 DO en 48 horas de incubación (Figura 4).

### Expresión de los genes asociados a fimbrias

Se monitoreó la formación de biopelícula en medio líquido a pH 6 tras incubar por 1, 3, 6, 24 y 48 horas, y se observó que la expresión del gen *hp0953*, que codifica para la proteína HP0953 homóloga a PilA, aumentaba considerablemente a las 3 horas de incubación (datos no mostrados), por lo que los experimentos posteriores únicamente se realizaron a este tiempo.

Se analizó la expresión de los genes *flhF*, *glmM*, *virB2* y *hp0953* durante el proceso de formación de biopelícula (a 0, 1 y 3 horas) a pH 4, pH 6 y en presencia de células de

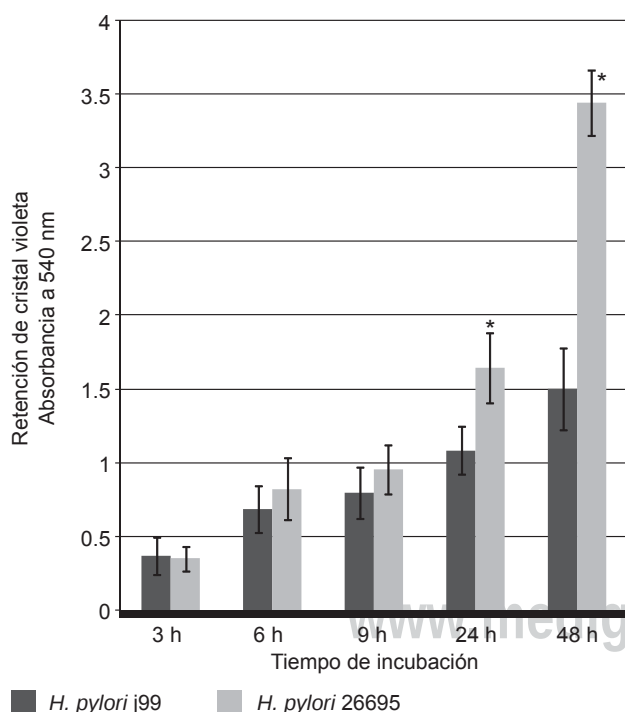
cáncer gástrico (AGS). Se encontró que a pH 4 a 1 hora de incubación, los genes *flhF*, *hp0015* y *hp0953* se expresan más y disminuyen su expresión a las 3 horas de incubación (Figura 5). Por otro lado, a pH 6, la expresión del gen *flhF* aumenta a partir de 1 hora de incubación y la expresión de *hp0953* aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) a las 3 horas, comparado con los otros genes. En presencia de células, la expresión de *flhF* y *hp0015* aumentan a 1 hora. Sin embargo, la expresión de *flhF* y *hp0953* aumenta a las 3 horas en mayor proporción que los demás genes.

En la figura 6 se observa la expresión de los genes *flhF*, *hp0015* y *hp0953* con respecto al gen constitutivo *glmM* ( $p < 0.05$ ). Se observa que en el tiempo 0, la expresión de los genes *hp0015* y *0953* está por debajo de la expresión del gen de *glmM*. Por el contrario, a las 3 horas de incubación se observa que la expresión del gen *hp0953* resulta significativamente mayor con respecto al gen *glmM*.

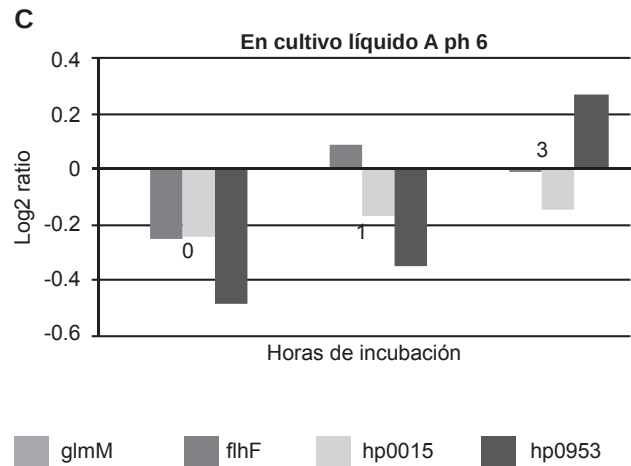
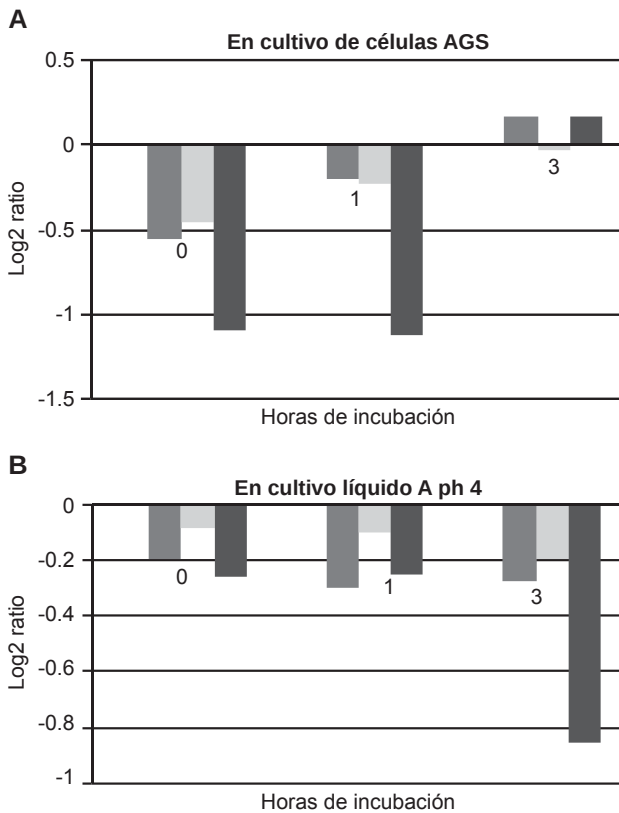
### DISCUSIÓN

La identificación de proteínas homólogas es cada vez más importante en la biología moderna. Los estudios biológicos tradicionales se han centrado en sistemas modelo, y estos estudios proporcionan gran cantidad de recursos para investigar otras especies.<sup>28</sup> La identificación de homólogos puede llevarse a cabo con programas, a través de la comparación de una secuencia problema con secuencias similares que se encuentran en una base de datos. Sin embargo, este proceso no es trivial, ya que dos proteínas homólogas pueden estar separadas por mucho tiempo de evolución, y por lo tanto, su relación evolutiva puede ser muy difícil de detectar. A las proteínas evolutivamente lejanas se les llama homólogos remotos. Una gran proporción de las proteínas previstas, entre 30-40% aproximadamente, no tienen una función específica asignada, y no se pueden relacionar con alguna función conocida en la base de datos. Esto sucede incluso en organismos bien estudiados.<sup>28</sup>

En el estudio se encontraron proteínas de *H. pylori* que son homólogos remotos de aquellas que ensamblan fimbrias en otras bacterias. Esto sugiere que existe una gran distancia evolutiva entre ellas, por lo que resulta difícil predecir si su función es la misma. Sin embargo, el análisis de la hidrofobicidad, hidrofiliidad, antigenicidad y dominios transmembranales de la secuencia indican que las proteínas hipotéticas encontradas (*jhp0257* y *HP0272*) y las proteínas de ensamblaje fimbrial de *C. rectus* y *X. fas-*



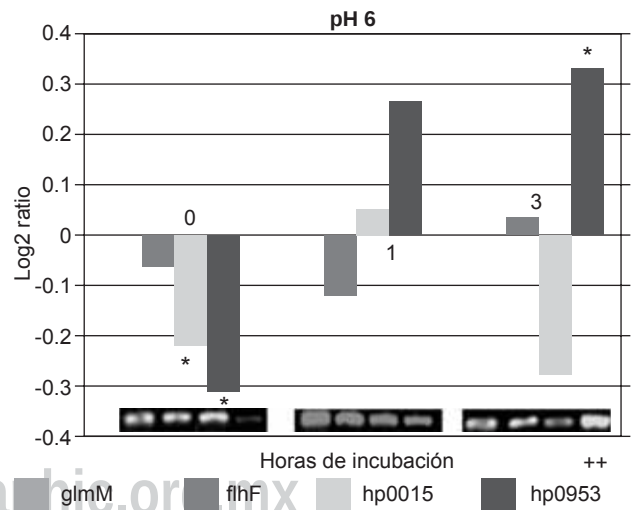
**Figura 4.** Las cepas de *H. pylori* 26695 y J99 producen biopelícula desde las 3 horas de incubación. Significativamente, la cepa 26695 produce mayor cantidad de biopelícula que la cepa J99 a las 24 y 48 horas, \* $p < 0.05$ .



**Figura 5.** Expresión de los genes *glmM*, *flhF*, *hp0015* y *hp0953* de *H. pylori* 26695 durante la formación de biopelícula en diferentes condiciones. **A)** Los genes *flhF* y *hp0953* aumentan su expresión después de 3 horas de incubación en cultivo de células AGS. **B)** En cultivo líquido a pH 4 los genes no muestran aumento en la expresión, contrariamente el gen *hp0953* (homólogo a *pilA*) muestra la más baja expresión a las 3 horas. **C)** En contraste, se observa un cambio significativo en la expresión del gen en cultivo líquido a pH 6 después de 3 horas de incubación.

*tidiosa* son muy similares, de modo que estas proteínas podrían tener la misma función.

Estudios realizados por PA Castric y CD Deal en 1994, con *PilA* de diferentes cepas de *P. aeruginosa*, demostraron que sólo existe un área conservada al inicio de la secuencia y el resto es variable.<sup>29</sup> Los mismos resultados se obtuvieron para la proteína HP0953 de *H. pylori*. La región conservada pertenece a la subunidad de procesamiento de la proteína. Por su parte, Keizer y colaboradores, en 2001, realizaron el alineamiento de las proteínas de dos cepas de *P. aeruginosa*, y encontraron que entre ellas solamente había 40% de identidad, lo que habla de la gran variabilidad que existe entre este tipo de proteínas.<sup>30</sup> En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de unión a los receptores celulares, que también interactúa con superficies inertes, como acero inoxidable. Sin embargo, este dominio es semiconservado.<sup>31</sup> El alineamiento obtenido en este estudio muestra similitud con el extremo C-terminal de las secuencias analizadas. Las estructuras terciarias obtenidas muestran diferencias, debido a que en el modelaje no se toma en cuenta el procesamiento que pueden sufrir algunas proteínas. Sin embargo, la forma que presenta el péptido es señal indicativa de que



**Figura 6.** Expresión de los genes *glmM*, *flhF*, *hp0015* y *hp0953* de *H. pylori* 26695 a 0, 1 y 3 horas de la formación de biopelícula en medio líquido (a pH 6). Se observa diferencia en la expresión de los genes *hp0015* (homólogo a *vir B2* del SSTIV) y *hp0953* (homólogo a *PilA*) respecto al gen constitutivo *glmM* al tiempo 0. La expresión del gen *hp0953* aumenta significativamente a las 3 horas de incubación. \* $p < 0.05$ .

pueden ser transportadas hacia la misma región en la célula y, por consiguiente, presentar la misma función. Además, las proteínas encontradas pertenecen al mismo grupo de proteínas fimbriales y ambas ensamblan fimbria tipo IV.

Al realizar el ensayo de biopelícula, se observó que a mayor tiempo de incubación, aumenta la cantidad de bacterias adheridas a la superficie de la microplaca. Esto concuerda con las etapas de formación de biopelícula. Durante la primera etapa, la bacteria interactúa con la superficie, para lo cual debe haber un movimiento browniano, sedimentación o movimiento por flagelos. Posteriormente, las bacterias se adhieren irreversiblemente por la producción de una sustancia polimérica extracelular y, debido a la estimulación de proteínas receptoras de la pared bacteriana, se lleva a cabo el desarrollo de puentes célula-a-célula, lo que estabiliza la estructura formada en un proceso denominado maduración. Finalmente, se lleva a cabo la colonización de la superficie, donde las bacterias crecen formando microcolonias.<sup>32</sup>

De Souza y colaboradores, en 2004, encontraron que el gen *pilA* que codifica para la proteína PilA en *X. fastidiosa* se sobreexpresa durante la formación de la biopelícula.<sup>33</sup> Se sabe que estas adhesinas participan en la adhesión inicial a superficies. Por su parte, Caserta y colaboradores, en 2010, confirmaron que la proteína PilA de *X. fastidiosa* se expresaba considerablemente durante las primeras etapas de la formación de biopelícula, mientras que algunas adhesinas de membrana externa permanecen en niveles bajos o su expresión no presenta cambios.<sup>34</sup> Durante este estudio se observó que el gen *hp0953* de *H. pylori* se expresa en mayor proporción durante las primeras 3 horas de la formación de la biopelícula en medio de cultivo líquido y en presencia de células, lo que sugiere que su expresión puede estar relacionada con los eventos de adherencia a superficies inertes y celulares.

Por lo anterior, se concluye que *H. pylori* posee proteínas homólogas a las proteínas de familias fimbriales, específicamente PilN y PilA, que ensamblan fimbria tipo IV en otras bacterias, y que esta última tiene un nivel de expresión mayor durante la etapa inicial del proceso de formación de la biopelícula. Sin embargo, es necesario continuar con la caracterización de estos genes para determinar su relación con la producción de fimbrias tipo IV.

## AGRADECIMIENTOS

En memoria al Dr. Guillermo Mendoza Hernández quien ayudó sin reservas. El proyecto fue financiado por fondos

federales proyecto HIM/2011/025. La M en C. Nancy Karina Arteaga Resendiz recibió la beca de PROBEI y del Programa Nacional de Posgrado de Calidad de CONACYT.

*Autor de correspondencia:*

Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Correo electrónico: normave@himfg.edu.mx

## REFERENCIAS

1. Takeuchi H, Zhang YN, Israel DA, Peek RM Jr, Kamioka M, Yanai H, et al. Effect of *Helicobacter pylori* *cdtA* on interleukin-8 secretions and nuclear factor kappa B activation. *World J Gastroenterol* 2012;18:425-434.
2. Olivares D, Gisbert JP. Factores implicados en la patogenia de la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Enferm Dig* (Madrid) 2006;98:374-386.
3. Rivas F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed (México)* 2000;11:187-205.
4. Correa P, Piazuelo MB. Evolutionary history of the *Helicobacter pylori* genome: implications for gastric carcinogenesis. *Gut Liver* 2012;6:1-28.
5. Sánchez-Zauco NA, Giono-Cerezo S, Maldonado-Bernal C. Receptores tipo Toll, patogénesis y respuesta inmune a *Helicobacter pylori*. *Salud Publica Mex* 2010;52:447-454.
6. Rasmi Y, Seyyed-Mohammadzad MH. Frequency of *Helicobacter pylori* and cytotoxine associated gene A antibodies in patients with cardiac syndrome X. *J Cardiovasc Dis Res* 2012;3:19-21.
7. Dorer MS, Talarico S, Salama NR. *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000544.
8. Testerman TL, McGee DJ, Mobley HLT. Adherence and colonization. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, eds. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington: ASM Press; 2001. pp. 381-401.
9. Cole PS, Harwood J, Lee R, She R, Guiney DG. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2004;186:3124-3132.
10. Gamboa JL. Infección por *Helicobacter pylori* y enfermedad ulcerosa péptica. *Univ Diag* 2003;3:20-24.
11. Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Fukuda M, Kawakami H, Ochiai K, et al. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol* 2009;9:197.
12. Suescún AV, Cubillos JR, Zambrano MM. Genes involucrados en la biogénesis de fimbrias afectan la formación de biopelículas por parte de *Klebsiella pneumoniae*. *Biomédica* 2006;26:528-537.
13. Salomonsson EN, Forslund AL, Forsberg A. Type IV pili in *Francisella*—a virulence trait in an intracellular pathogen. *Front Microbiol* 2011;2:29.
14. Berry JL, Phelan MM, Collins RF, Adomavicius T, Tønnum T, Frye SA, et al. Structure and assembly of a trans-periplasmic channel for type IV pili in *Neisseria meningitidis*. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002923.

15. Karupiah V, Derrick JP. Structure of the PilM-PilN inner membrane type IV pilus biogenesis complex from *Thermus thermophilus*. J Biol Chem 2011;286:24434-24442.
16. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
17. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Disponible en: [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST\\_PROGRAMS=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)
18. Finn RD, Clements J, Eddy SR. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. Nucleic Acids Res 2011;39(Web Server issue):W29-W37.
19. Howard Hughes Medical Institute. HMMER. Disponible en: <http://hmmer.janelia.org>
20. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. J Mol Biol 2000;302:205-217.
21. Swiss Institute of Bioinformatics. T-Coffee. Disponible en: <http://tcffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&daction=TCOFFEE::Regular&referer0=embnet>
22. Deléage G, Clerc FF, Roux B, Gautheron DC. ANTHEPROT: a package for protein sequence analysis using a microcomputer. Comput Appl Biosci 1988;4:351-356.
23. Deléage G. Institute de Biologie et Chimie des Protéines. ANTHEPROT. Disponible en: <http://antheprot-pbil.ibcp.fr>
24. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nature Protocols 2010;5:725-738.
25. Zhang Lab. I-TASSER Online. Protein Structure and Function Predictions. Disponible en: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>
26. Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence. Disponible en: <http://frodo.wi.mit.edu/>; <http://primer3.wi.mit.edu/>
27. Olivares A, Trejo JO, Arellano-Galindo J, Zuñiga G, Escalona G, Viguera JC, et al. pep27 and lytA in vancomycin-tolerant pneumococci. J Microbiol Biotechnol 2011;21:1345-1351.
28. Wan XF, Xu D. Computational methods for remote homolog identification. Curr Protein Pept Sci 2005;6:527-546.
29. Castric PA, Deal CD. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* pili based on sequence and B-cell epitope analyses. Infect Immun 1994;62:371-376.
30. Keizer DW, Slupsky CM, Kalisiak M, Campbell AP, Crump MP, Sastry PA, et al. Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 2001;276:24186-24193.
31. Giltner CL, van Schaik EJ, Audette GF, Kao D, Hodges RS, Hassett DJ, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesion for both biotic and abiotic surfaces. Mol Microbiol 2006;59:1083-1096.
32. Faleiro-Naves PL. Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología I. Universidad Complutense de Madrid. Madrid; 2009.
33. De Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Caldana C, Yanaí GM, Muto NH, et al. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. FEMS Microbiol Lett 2004;237:341-353.
34. Caserta R, Takita MA, Targon ML, Rosselli-Murai LK, de Souza AP, Peroni L, et al. Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2010;76:4250-4259.