

Programa de Estudios de Posgrado

**Desarrollo de Cepa de Levadura Productora de Factores  
Recombinantes que Estimulen el Sistema de Defensa  
Contra Infecciones Bacterianas**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos  
Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

**Claudia Celina López Bolaños**

**La Paz, B.C.S. Enero del 2009.**

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 11 del Mes de Diciembre del 2008, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Desarrollo de Cepa de Levadura Productora de Factores Recombinantes que Estimulen el Sistema de Defensa Contra Infecciones Bacterianas"**

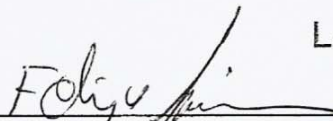
Presentada por el alumno:

**Claudia Celina López Bolaños**

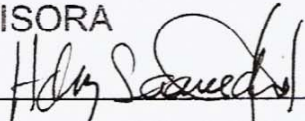
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

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

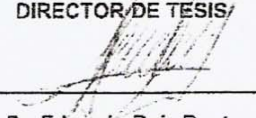
### LA COMISION REVISORA



Dr. Felipe Ascencio Valle  
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Norma Y. Hernández Saavedra  
CO-DIRECTOR DE TESIS



Dr. Eduardo Ruiz Bustos  
CO-TUTOR



Dra. Ma. Antonia Guzmán Murillo  
CO-TUTOR

Dra. Gracia Gómez Anduro  
CO-TUTOR



**DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,**  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**COMITÉ TUTORIAL**

<b>Dr. Felipe De Jesús Ascencio Valle</b> Co-Director de Tesis	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
<b>Dra. Norma Hernández Saavedra</b> Co-Director de Tesis	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
<b>Dra. María Antonia Guzmán Murillo</b> Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
<b>Dr. Eduardo Ruíz Bustos</b> Co-Tutor	Universidad de Sonora
<b>Dra. Gracia Gómez Anduro</b> Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

**COMITÉ SINODAL**

Co-Director de Tesis: Felipe De Jesús Ascencio Valle  
Co-Director de Tesis: Norma Yolanda Hernández Saavedra  
Co-Tutora: Dra. María Antonia Guzmán Murillo  
Co-Tutor: Dr. Eduardo Ruíz Bustos.  
Co-Tutor: Dra Gracia Gómez Anduro

**SUPLENTE**

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

## RESUMEN

Proteínas de membrana externa y otros componentes de superficie de *Helicobacter pylori*, son las principales moléculas reconocidas por el sistema inmune. El desarrollo de vacunas terapéuticas contra antígenos específicos de *H. pylori*, ha resultado en beneficios parciales. Se reconoce que el uso de terapias alternativas, el estudio de nuevos antígenos y el desarrollo de nuevas vías de administración, permitirán en un futuro cercano contribuir a la prevención de enfermedades gastrointestinales causadas por esta bacteria. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el uso potencial de *Saccharomyces cerevisiae* para el desarrollo de vacunas orales, que produzcan proteínas antigénicas de membrana externa de *H. pylori*, involucradas en la adhesión a componentes gastrointestinales.

Con la finalidad de diseñar y construir levaduras recombinantes con factores de adhesión de *H. pylori*, la presente tesis se enfocó en tres objetivos particulares: A) identificar proteínas de membrana de *H. pylori* 25 que reconozcan a sulfato de heparina (HSBPs), implicadas en la adhesión a células epiteliales, B) clonar y caracterizar molecularmente a los genes que codifican para dichas adhesinas y, C) construir cepas de *S. cerevisiae* recombinantes que expresen a estas adhesinas antigénicas.

Como resultados, se identificó a dos proteínas de membrana externa en la cepa de *H. pylori* 25, de peso molecular aparente de 47 y 51 kDa, que se denominaron HSBP47 y HSBP51. Ambas proteínas mostraron afinidad por sulfato de heparina, propiedad comúnmente asociada a adhesinas bacterianas. Anticuerpos policlonales producidos contra HSBP47 y HSBP51, inhibieron significativamente la adhesión de *H. pylori* 25 a células epiteliales *in vitro*, lo que sugiere que HSBP47 y HSBP51 están implicadas en el proceso de adhesión.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificaron fragmentos parciales de los genes *hsbp47* y *hsbp51*. Se obtuvo un segmento del gen *hsbp47* de 605 pb que codifica para un fragmento de 209 aa. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica indica que el gen *hsbp47* tiene un dominio conservado similar al factor de elongación EF-Tu. Por otro lado, para el gen *hsbp51* se obtuvo un fragmento de ~ 950 pb el cual revela una identidad del 67% con una proteína hipotética de *Y. pseudotuberculosis* y del 40% con una proteína hipotética de *H. pylori* J99.

Se subclonaron los genes *hsbp47* y *hsbp51* en el vector de expresión pYD1 para la construcción de levaduras recombinantes denominadas Aga2-HSBP47 y Aga2-HSBP51. Se evaluó su expresión con la inducción por galactosa a diferentes tiempos, observándose una expresión significativa de la proteína recombinante Aga2-HSBP47, con niveles del 53-51% detectados por ELISA indirecta y un 30% mediante microscopia de fluorescencia

Con esta investigación se amplía el conocimiento sobre los mecanismos de adhesión de *H. pylori* y establece, por primera vez, el potencial uso de levaduras recombinantes con genes que codifican para proteínas antigénicas para el control de infecciones por *H. pylori*.

**Palabras clave:** *Saccharomyces cerevisiae*, *H. pylori*, vacuna, expresión, antígeno, HSBPs.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* outer membrane proteins and other surface components are likely targets for recognition by host immune system. Vaccines produced against particular antigens have shown partial beneficial results. It is recognized that alternative therapies, studies on the characterization of new antigens, and alternatives in the administration via, will contribute to prevent gastrointestinal diseases caused by *H. pylori*.

Thus the aim of this study was to explore the potential use of *Saccharomyces cerevisiae* as oral vaccine, through the expression of recombinant antigenic outer membrane proteins of *H. pylori*. These proteins recognize heparan sulfate and are involved in adhesion to gastrointestinal components.

In order to design and construct recombinant yeast expressing adhesion factors from *H. pylori*, this thesis focused on the following particular objectives: A) to identify outer membrane proteins from *H. pylori* 25 that bind heparan sulfate, involved in adhesion to epithelial cells (adhesins); B) molecular cloning and characterization of genes encoding for these adhesins; C) construction of recombinant strains of *S. cerevisiae* expressing the antigenic adhesins.

It was identified two outer membrane proteins (OMPs) from *H. pylori* of relative molecular weight 47.2 and 51 kDa, called HSBP47 and HSBP51. Both proteins showed affinity for heparan sulfate, property commonly associated to bacterial adhesion. Polyclonal antibodies produced against HSBP47 and HSBP51 significantly inhibited adherence of *H. pylori* 25 to epithelial cells *in vitro*, suggesting HSBP47 and HSBP51 proteins are involved in their adhesion.

Through a polymerase chain reaction (PCR) the *hsbp47* and *hsbp51* genes were amplified. A 605 bp fragment of the *hsbp47* gene encoding a 209 aa polypeptide was obtained. The deduced amino acid sequence indicates that *hsbp47* has retained a domain of elongation factor Tu (EF-Tu). While from the *hsbp51* gene a fragment of ~ 950 bp was obtained which

showed a 67% identity with a hypothetical protein from *Y. pseudotuberculosis* and 40% with a *H. pylori* J99 hypothetical protein.

For the construction of recombinant yeast named HSBP47-Aga2 and Aga2-HSBP51, the genes were cloned in the pYD1 expression vector under the control of the pGAL1 promoter. The expression was evaluated by the induction with galactose at different times, obtaining only significant expression of recombinant protein Aga2-HSBP47 (53-51%) as measured by the indirect ELISA, and of 30% by fluorescence microscopy.

With this research we expand the knowledge about the mechanisms of adhesion of *H. pylori* and establish for the first time, the potential use of recombinant yeast with genes that code for antigenic proteins of infection as control against *H. pylori*.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, *Helicobacter pylori*, vaccine, expression, antigen, HSBPs.

**DEDICATORIA**

*A Dios*

*A mis padres*

*A la familia*

*A mi preciosa y traviesa hija Frida Camila*

*A mi esposo Eduardo*

*A Roberto Carlos Vázquez Juárez (†).*



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy sinceramente a mis directores de tesis. Dra. Norma Hernández Saavedra por su constante apoyo, confianza, infinita paciencia y sus grandes consejos en mi trabajo. El transmitirme que no siempre las cosas salen a la primera y que es mejor morir en el intento que morir sin haberlo intentarlo.

Mi entera gratitud al Dr. Felipe Ascencio por la confianza y las facilidades para llevar a cabo mi trabajo de investigación y por adoptarme hace muchos años como su estudiante y ofrecerme su amistad.

A los miembros de mi comité tutorial y revisor de tesis: Dra. Ma. Antonia Guzmán, Dr. Eduardo Ruíz Bustos, Dra. Gracia Gómez, por sus sugerencias y críticas, y por estimularme para sacar adelante este trabajo, contando siempre con su apoyo incondicional.

Al CONACYT le agradezco por otorgarme la beca No. 158432.

Gracias a la Dra. Thelma Castellanos Cervantes, Directora del Posgrado del CIBNOR, por su apoyo y respaldo que me permitieron llevar mi trabajo de tesis a buen término.

Agradezco al personal de Posgrado, Administración, Biblioteca, Informática, Redes, Taller de mantenimiento y maquinado, Vigilantes, su valiosa ayuda permite hacer el trabajo una realidad.

Agradezco a los amigos que con sus conocimientos me ayudaron a hacer mi trabajo experimental menos pesado: Tony Guzmán (cultivo de células, inmunización y toma de muestras), Arturo Sierra (asistencia técnica) y Roberto Carlos Vázquez Juárez † (técnicas y conocimientos).

A mis amiguitos de laboratorio (Maria Esther, Mau, Perliux, Calin, Martha, Norma, Rosario, *et al.*, fin a toda la patobanda) por haber hecho del laboratorio un lugar agradable donde pasar la mayor parte del tiempo era sentirse como en casa.

Agradezco a los técnicos y amigos de la Unidad de Patología Marina (Delia, Manuel, Hever, Chula y Julio) por su confianza, disponibilidad y entero apoyo.

Agradezco a mis demás amigos cibeños, Angel Campa, Carmen Blázquez, Pedro Cruz, Toni (biblioteca), Manuel Melero, Horacio Sandoval, Bety Gálvez, Brenda y Martha por su ayuda, consejos, y sonrisas compartidas.

Agradezco a mis viejos y nuevos amigos por su valiosa amistad, buenas vibras, apoyo incondicional y buenos deseos en ésta difícil etapa (Rosa María, Silvia, Ada Maribel, Carlos, Yhassir, Carmen, Linda, Rosy, Mari Chuy, Güera, Lupita).

Agradezco a toda mi familia (hermanos, sobrinos, cuñadas) por el apoyo otorgado principalmente a mi Madre Carmen porque detrás de mí siempre estará ella y sin su apoyo esto simplemente no sería posible.

**GRACIAS A TODOS!!!**

## PREFACIO

**El presente trabajo de tesis doctoral está basado en los siguientes artículos y manuscritos en preparación, que están referidos con los números romanos I, II y III.**

- I. Claudia C. López-Bolaños, María A. Guzmán-Murillo, Eduardo Ruiz-Bustos, and Felipe Ascencio. 2008. Role of heparan sulfate on adhesion of 47 kDa and 51 kDa outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells. (Aceptado).
  
- II. C.C. López-Bolaños, N. Hernández-Saavedra, E. Ruiz-Bustos, M.A. Guzmán-Murillo and F. Ascencio. 2008. Sequence and cloning sequence of gen hsbp47 encoding outer membrane protein from *Helicobacter pylori* (en preparación).
  
- III. C.C. López-Bolaños, N. Hernández-Saavedra, E. Ruiz-Bustos, M.A. Guzmán-Murillo and F. Ascencio. 2008. Expression of Heparan sulfate-binding protein HSBP47.2 from *Helicobacter pylori* on *Saccharomyces cerevisiae* (enviado).

### **Secuencias depositadas en el GenBank:**

- IV. López-Bolaños *et al.*, 2009. *Helicobacter pylori* strain 25, outer membrane protein gene, parcial. No. 1171151. GenBank (NCBI).

## ÍNDICE GENERAL

ACTA DE LIBERACIÓN TESIS.....	<i>i</i>
COMITÉ TUTORIAL.....	<i>ii</i>
RESUMEN.....	<i>iii</i>
ABSTRACT.....	<i>v</i>
DEDICATORIA.....	<i>vii</i>
AGRADECIMIENTOS.....	<i>viii</i>
PREFACIO.....	<i>x</i>
ÍNDICE GENERAL.....	<i>xi</i>
LISTA DE FIGURAS.....	<i>xiv</i>
LISTA DE TABLAS.....	<i>xv</i>
ABREVIATURAS.....	<i>xvi</i>
INTRODUCCION.....	1
1.1 Levaduras .....	1
1.1.1 Generalidades .....	1
1.1.2 Uso y aplicaciones.....	3
1.1.3 Sistemas de expresión en levaduras .....	4
1.1.4 Ventajas de utilizar sistemas de expresión en levaduras .....	4
1.1.5 Vector de expresión pYD1 .....	6
1.2 Modelo de estudio: <i>Helicobacter pylori</i> .....	7
1.2.1 Generalidades .....	7
1.2.2 Microbiología .....	8
1.2.3 Genoma.....	9
1.2.4 Proteínas de membrana externa.....	10
1.2.5 Mecanismo de patogenicidad .....	11
1.2.5.1 Ureasa y flagelos .....	11
1.2.5.2 Adhesión y colonización .....	12
1.2.5.3 Mecanismos de acción.....	13
1.2.6 Terapias .....	14
1.2.6.1 Terapias alternativas.....	15
2. JUSTIFICACION.....	17

3. HIPÓTESIS .....	19
4. OBJETIVOS .....	20
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
5. METODOLOGÍA .....	21
5.1 Extracción de proteínas de membrana de <i>H. pylori</i> (HSBP47 y HSBP51) y su participación en la adherencia a células <i>HeLa S3y Kato III</i> . .....	21
5.2 Clonación de genes <i>hsbp47</i> y <i>hsbp51</i> de <i>H. pylori</i> en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . .....	22
5.3 Subclonación de genes <i>hsbp47</i> y <i>hsbp51</i> en <i>S. cerevisiae</i> y la inducción de proteínas recombinantes. ....	22
5. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA .....	24
6. RESULTADOS .....	25
Parte I.....	25
6.1 Extracción de proteínas de membrana de <i>H. pylori</i> 25 (HSBP47 y HSBP51) y su participación de en la adhesión a células <i>HeLa S3y Kato III</i> . ....	25
6.1.2 Producción de anticuerpos policlonales en ratones BALB/c .....	26
Parte II.....	31
6.2. Clonación de genes <i>hsbp47</i> y <i>hsbp51</i> de <i>H. pylori</i> 25 en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . ....	31
6.2.1 Análisis de secuencias de aminoácidos de la proteína HSBP47 .....	31
6.2.2 Análisis de secuencias de aminoácidos de la proteína HSBP-51 .....	32
6.2.3 Amplificación de fragmentos génicos <i>hsbp47</i> y <i>hsbp51</i> por PCR .....	34
Parte III.....	37
6.3. Subclonación de genes <i>hsbp47</i> y <i>hsbp51</i> en <i>S. cerevisiae</i> e inducción de proteínas recombinantes. ....	37
6.3.1 Inducción de la expresión de proteínas HSBP47 y HSBP51 en superficie de levadura <i>S. cerevisiae</i> EBY- 100. ....	39
6.3.2 Detección de proteínas heterólogas mediante técnicas electroforéticas. ....	39
6.3.3 Detección de proteínas recombinantes por medio de la técnica de microscopía de fluorescencia. ....	40
6.3.4 Detección de proteínas recombinantes por medio de la técnica de ELISA indirecta. .	41
6.3.5 Análisis bioinformático de construcción pYD1/ <i>hsbp47</i> y pYD1/ <i>hsbp51</i> .....	43

6.4 Resumen de Resultados.....	45
7. DISCUSIÓN.....	47
8.CONCLUSION.....	54
9. PERSPECTIVAS.....	55
10. BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXO I.....	67
ANEXO II.....	93
ANEXO III.....	108

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
<b>Figura 1.</b>	Microfotografía de una levadura tipo <i>S. cerevisiae</i> EBY-100 (aumento 100x).....	1
<b>Figura 2.</b>	Representación esquemática del vector de expresión pYD1 (fuente: <a href="http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pyd1_map.pdf">http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pyd1_map.pdf</a> ).....	6
<b>Figura 3.</b>	Representación esquemática de la interacción <i>Aga1</i> con <i>Aga2</i> (fuente: <a href="http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pyd1_map.pdf">http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pyd1_map.pdf</a> ).....	7
<b>Figura 4.</b>	Morfología colonial y microscopica de <i>H.pylori</i> , y su representación esquemática en contacto con el epitelio gástrico (fuente: <a href="http://www.science.org.au/nobel/2005/05diagram4.htm">www.science.org.au/nobel/2005/05diagram4.htm</a> ).....	8
<b>Figura 5.</b>	Representación gráfica del genoma <i>H. pylori</i> 26695 (fuente: <a href="http://www.helicobacterspain.com/imagenes/rgg26695.htm">http://www.helicobacterspain.com/imagenes/rgg26695.htm</a> ).....	9
<b>Figura 6.</b>	Diagrama de flujo general de la metodología (por bloque) empleada en este estudio. <b>I)</b> Extracción y purificación de OMP's; <b>II)</b> Clonación y caracterizaron los genes que codifican OMP's; <b>III)</b> Subclonación de los genes clonados en vectores de expresión.....	24
<b>Figura 7.</b>	Perfil electroforético de OMP's de <i>H. pylori</i> . Paneles: <b>(A)</b> proteínas de membrana de <i>H. pylori</i> 25 resueltas en un gel desnaturizante (SDS-PAGE) al 12%. <b>(B)</b> Western blot de OMPs con reconocimiento de sulfato de heparina resueltas en gel SDS-PAGE al 12%.....	25
<b>Figura 8.</b>	Titulación de sueros hiperinmunes por la técnica de ELISA indirecta.....	26
<b>Figura 9.</b>	Dot Blot de OMPs-HSBPs totales y purificadas (47 kDa y 51 kDa) bloqueadas y probadas con los sueros: <b>A)</b> , anti-HSBPs totales; <b>B)</b> , anti-HSBPs 47 + 51; <b>C)</b> , anti-HSBP47; <b>D)</b> , anti-HSBP51.....	27
<b>Figura 10.</b>	Western blot de proteínas de membrana (OMPs) de <i>H. pylori</i> usando sueros con diferente especificidad. Carril: <b>1)</b> anti-HSBPs; <b>2)</b> anti-HSBP47 + HCBP51; <b>3)</b> anti-HSBP47 y <b>4)</b> anti-HSBP-51. M, marcador de masa molecular.....	28
<b>Figura 11.</b>	Inhibición de la adhesión de <i>H. pylori</i> a células Kato III <b>(A)</b> y HeLa S3 <b>(B)</b> con anticuerpos contra las proteínas HSBP47, HSBP51 y una mezcla de estas mismas (HSBP47 + HSBP51).. ..	30
<b>Figura 12.</b>	Diseño de oligos degenerados para la amplificación del gen <i>hsbp47</i> .....	32

<b>Figura 13.</b> Diseño de oligos degenerados para la amplificación del gen <i>hsbp51</i> .....	<b>33</b>
<b>Figura 14.</b> Productos de amplificación, mediante PCR, de los genes <i>hsbp</i> usando varias combinaciones de oligonucleotidos degenerados.....	<b>35</b>
<b>Figura 15.</b> Clonación de los fragmentos génicos de <i>hsbp</i> de <i>H. pylori</i> en pYD1.....	<b>38</b>
<b>Figura 16.</b> Análisis electroforético de OMPs de <i>S. cerevisiae</i> EBY100 extraídas con DTT. ....	<b>40</b>
<b>Figura 17.</b> Microscopia de fluorescencia para la detección de OMP's recombinantes en <i>S. cerevisiae</i> EBY100.....	<b>41</b>
<b>Figura 18.</b> ELISA indirecta para la detección de proteína recombinante Aga2-HSBP47.....	<b>42</b>
<b>Figura 19.</b> Secuencias de nucleótidos y aminoácidos (deducida) de un fragmento de gen <i>hsbp47</i> de <i>H. pylori</i> .....	<b>43</b>
<b>Figura 20.</b> Representación esquemática del dominio GTP-EF-TU, localizado del aminoacido 18 al 33 del de la secuencia de aminoacidos deducida del fragmento del gen fragmento de gen <i>hsbp47</i> .....	<b>44</b>



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla I</b>	Inhibición de la adhesión de <i>H. pylori</i> 25 a células HeLa S3 y Kato III con proteínas HSBPs.....	<b>29</b>
<b>Tabla II</b>	Porcentaje de desplazamiento de <i>H. pylori</i> 25 a células HeLa S3 y Kato III usando los antisueros HSBP47, HSBP51 y HSBP47 + HSBP51.....	<b>30</b>
<b>Tabla III</b>	Péptidos internos de la proteína HSBP47 de <i>H. pylori</i> 25.....	<b>31</b>
<b>Tabla IV</b>	Secuencia de nucleótidos de los oligos diseñados a partir de péptidos internos de la proteína HSBP47 de <i>H. pylori</i> 25.....	<b>32</b>
<b>Tabla V</b>	Péptidos internos de la proteína HSBP51 de <i>H. pylori</i> 25.....	<b>33</b>
<b>Tabla VI</b>	Secuencia de nucleótidos de los oligos diseñados a partir de péptidos internos de la proteína HSBP51 de <i>H. pylori</i> 25.....	<b>34</b>
<b>Tabla VII</b>	Combinación de oligos para la amplificación de fragmentos <i>hsbp47</i> y <i>hsbp51</i> .....	<b>34</b>
<b>Tabla VIII</b>	Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes <i>hsbp47</i> y <i>hsbp51</i> y clonación en el vector de expresión pYD1.....	<b>37</b>

**ABREVIACIONES**

<b>ADN</b>	Acido Desoxiribonucléico
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CBB</b>	Azul Coomasie R-250
<b>dNTPs</b>	Mezcla de Desoxiribonucleótidos Trifosfatados
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Acido etilen-diamino-tetracético (siglas en inglés)
<b>EF-Tu</b>	Factor de elongación –Tu.
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (siglas en inglés)
<b>EtBr</b>	Bromuro de etidio
<i>et al.</i>	y colaboradores (abreviación en latín)
<b>h</b>	Hora (s)
<b>HSBP</b>	Proteína con afinidad por sulfato de heparina (s)
<b>HSBP47</b>	Proteína con afinidad por sulfato de heparina de 47 kDa
<b>HSBP51</b>	Proteína con afinidad por sulfato de heparina de 51 kDa
<i>hsbp47</i>	Gen que codifica para la proteína HSBP47
<i>hsbp51</i>	Gen que codifica para la proteína HSBP51
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>kpb</b>	Kilopares de bases
<b>l</b>	Litro
<b>M</b>	Concentración molar
<b>mM</b>	Concentración milimolar
<b>mg</b>	Miligramo (s)
<b>µg</b>	Microgramo (s)
<b>min</b>	Minutos

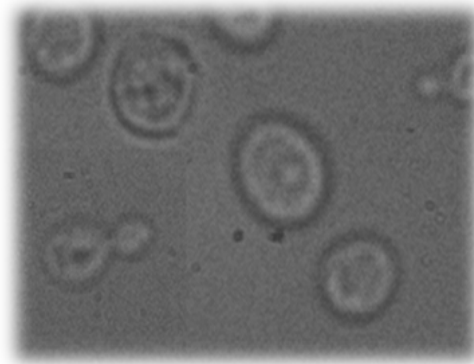
<b>ml</b>	Militros
<b>Mr</b>	Movilidad relativa
<b>μl</b>	Microlitro (s)
<b>ng</b>	Nanogramo (s)
<b>OMPs</b>	Proteínas de membrana externa
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>SDS</b>	Dodecil-sulfato de sodio (siglas en inglés)
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (siglas en inglés)
<b>%</b>	Por ciento

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Levaduras

#### 1.1.1 Generalidades

Las levaduras han sido un modelo de estudio desde hace más de cien años. Su nombre genérico agrupa a una variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, así como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad en la industria; por lo que, constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad (Broach *et al.*, 1991) (Figura 1).



**Figura 1.** Microfotografía de una levadura tipo *S. cerevisiae* EBY-100 (aumento 100x).

Las levaduras se multiplican tanto asexualmente como sexualmente. En la división asexual, las células individualizadas se dividen por gemación o por división directa (fisión), mientras que las que se reproducen sexualmente, generan unas estructuras llamadas ascas, que contienen hasta 8 esporas. Estas ascosporas pueden fusionarse entre sí y originar un nuevo individuo que podrá multiplicarse a través de una división vegetativa (Lewin, 2001).

En su crecimiento, hay especies de levaduras que pueden formar filamentos que dan lugar a micelios típico de los hongos.

Desde el punto de vista científico, las levaduras se han estudiado como modelo biológico, en donde han contribuido de manera muy importante en la elucidación de los procesos básicos de la fisiología celular. Este modelo experimental presenta varias ventajas como son: i) ser un sistema eucariota, ii) tener una complejidad sólo ligeramente superior al de las bacteria pero, compartiendo con ella muchas de sus ventajas técnicas, iii) crecimiento rápido, iv) dispersión de las células, v) facilidad de replicación de los cultivos y vi) facilidad para aislar mutantes. De esto último se destacan las levaduras por ser un sistema sencillo y versátil de transformación de ADN. Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite su manipulación con precauciones mínimas de manejo (Zhang *et al.*, 1996, Schreuder *et al.*, 1996).

*S. cerevisiae* es un sistema genético que, a diferencia de la mayoría de otros microorganismos, presenta dos fases biológicas estables: haploide y diploide. La fase haploide permite generar, aislar y caracterizar mutantes con mucha facilidad, mientras que en la diploide se pueden realizar estudios de complementación. Una levadura haploide contiene 16 cromosomas que varían en tamaño de 200 a 2,200 kilobases (Lewin, 2001).

Una ventaja adicional de este microorganismo consiste en que se conoce la secuencia completa de su genoma y se mantiene en constante revisión. Esto ha permitido la manipulación genética de los casi 6600 genes anotados en el genoma de esta levadura, el uso extensivo de micromatrices de ADN para investigar el transcriptoma, así como estudios a escala genómica como son la expresión génica, localización de proteínas y la organización funcional del genoma y el proteoma (Giaever *et al.*, 2002).

### 1.1.2 Uso y aplicaciones

*S. cerevisiae* ha sido utilizada en procesos industriales, de los que los más relevantes son la producción de cerveza, pan y vino; gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación. Básicamente, este proceso se lleva a cabo cuando ésta levadura se encuentra en un medio rico en azúcares (como la D-glucosa). En condiciones de escasez de nutrientes, la levadura utiliza otras rutas metabólicas que le permiten obtener un mayor rendimiento energético, y por tanto no realiza la fermentación (Psomas *et al.*, 2002).

Otra de las aplicaciones de *S. cerevisiae*, han sido en el área científica, en donde se ha empleado como modelo biológico y ha contribuido de manera muy importante a elucidar los procesos básicos de la fisiología celular (Stubbs y Wilson, 2002). Por otro lado, se le han introducido genes de eucariotas superiores para el análisis sistemático de su función, sabiendo que la maquinaria molecular de muchos procesos celulares se encuentra conservada tanto en levadura, plantas como mamíferos (Rodríguez *et al.*, 2002, Stubbs y Wilson, 2002). Por estas razones, *S. cerevisiae* se ha convertido en una importante herramienta de análisis de genómica funcional a gran escala, proporcionando un punto de partida para el análisis de organismos eucariotas más complejos. Al ser un organismo unicelular con una tasa de crecimiento rápida, la levadura puede utilizarse para estudios que resultarían muy complicados o costosos en organismos multicelulares.

### 1.1.3 Sistemas de expresión en levaduras

*S. cerevisiae* ha sido modificado para expresar diferentes genes heterólogos durante los últimos 25 años. Debido a que cumple con todas las regulaciones de bioseguridad para aplicaciones en humanos, *S. cerevisiae* se ha usado en la producción de herramientas farmacológicas como la vacuna de la hepatitis B (Di Miceli *et al.*, 2006) y en la actualidad se está estudiando su uso en la producción de la vacuna del hantavirus, el causante de la fiebre hemorrágica coreana (Antoniukas *et al.*, 2006).

Al compartir muchas características moleculares, genéticas y bioquímicas con los organismos superiores, se ha confirmado el potencial comercial de los sistemas de expresión en levaduras. Actualmente, *Pichia pastoris* (Cregg *et al.*, 2000) y *Schizosaccharomyces pombe* (Giga-Hama y Kumagai, 1999) son sistemas habituales de expresión de proteínas heterólogas. Mientras tanto, otras levaduras “no convencionales” se han establecido como sistemas de expresión, por ejemplo: *Arxula adenivorans* (Terentiev *et al.*, 2004), *Hansenula polymorpha* (Kulkarni *et al.*, 2006), *Kluyveromyces lactis* (Donnini *et al.*, 2004) y *Yarrowia lipolytica* (Madzak *et al.*, 2005).

### 1.1.4 Ventajas de utilizar sistemas de expresión en levaduras

De acuerdo con reportes bibliográficos en donde se han descrito los beneficios sobre el uso de levaduras como herramienta molecular, se pueden resaltar los siguientes puntos:

- a) Simplicidad de cultivo, crecimiento rápido y a bajo costo, características similares a las presentadas por *Escherichia coli*.
- b) Las levaduras tienen un sistema de endomembranas que permiten que algunas proteínas sintetizadas intracelularmente sean secretadas al espacio extracelular.

- c) Las levaduras, como eucariotas unicelulares, pueden producir proteínas recombinantes, correctamente plegadas y solubles, que han sufrido todas las modificaciones postraduccionales esenciales para ser funcionales (Daly y Hearn, 2005).
- d) Las levaduras representan un sistema seguro garantizado por la ausencia de endotoxinas y sustancias oncogénicas.
- e) Las células de levaduras son más fáciles de cultivar y manipular genéticamente que las células de mamíferos, además de que se pueden cultivar a altas densidades.
- f) Las levaduras metilotróficas son un huésped muy popular para la expresión de una variedad de proteínas eucariotas y procariotas. Hasta el año 2000, más de 200 proteínas humanas, de virus, bacterias, hongos, animales y plantas se han expresado satisfactoriamente en *P. pastoris* (Cregg *et al.*, 2000), de manera tal que muestran características especialmente ventajosas como huésped para la producción de proteínas de importancia farmacéutica.
- g) El uso de vectores mixtos facilita la transformación de levaduras. Los vectores mixtos que se pueden replicar en dos especies diferentes (*E. coli* y levaduras) se usan para transformar genes foráneos en células de levaduras. El gen foráneo es clonado en el vector mixto *in vitro*; y la construcción se introduce en *E. coli* para seleccionar la construcción correcta, lo que hace más simple la manipulación genética en las levaduras.
- h) Una ventaja adicional de las levaduras es la disponibilidad de potentes promotores para controlar la expresión de los genes de interés, facilitando la producción de grandes cantidades de proteína de forma más económica que la mayoría de sistemas eucariotas (Border y Wittrup, 1997).

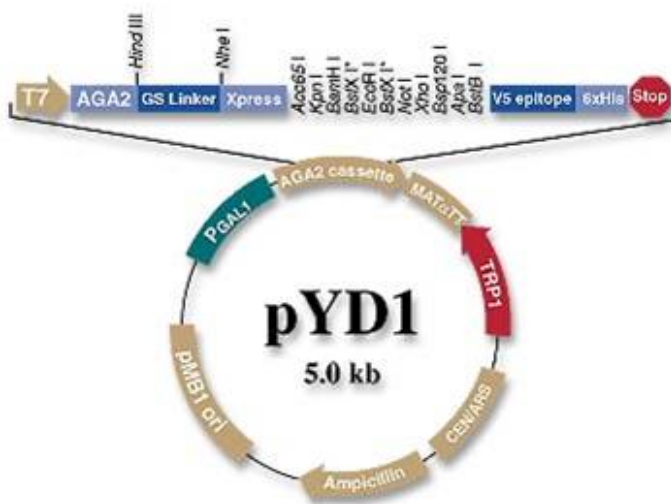


### 1.1.5 Vector de expresión pYD1

El vector pYD1 (yeast display vector, Invitrogen) está específicamente diseñado para direccionar y expresar proteínas recombinantes en la superficie de *S. cerevisiae* (Figura 2). Las proteínas pueden ser analizadas por su habilidad para interactuar con ligandos de interés. El vector contiene caja AGA2 (AGA2 cassette, Figura 2), que consiste de:

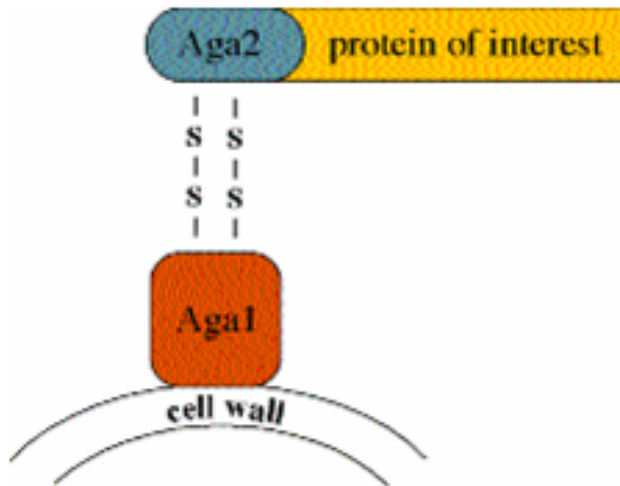
- una secuencia para el gen *Aga2*
- una secuencia de corte para una enteroquinasa
- un epítipo Xpress
- un sitio múltiple de clonación (MCS)
- un epítipo V5
- una cola poli His-6 y un codón de parada

Además, contiene un promotor inducible por galactosa (PGAL1), un origen de replicación de alto número de copias en bacterias (pMB1ori), un gen de resistencia a ampicilina (Ampicillin, codifica  $\alpha$ -lactamasa), un origen de replicación en levaduras (CEN/ARS) y un marcador de selección para eucariotas (TRP1).



**Figura 2.** Representación esquemática del vector de expresión pYD1 (fuente: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pyd1\\_map.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pyd1_map.pdf)).

La estrategia para la construcción de recombinantes se basa en la interacción entre las proteínas Aga1 y Aga2. En levaduras, estas dos proteínas están asociadas con la vía secretoria, de modo que Aga2 interactúa con Aga1, que está anclada en la pared celular, formando puentes disulfuro y exponiendo a Aga2 hacia el espacio extracelular (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de la interacción *Aga1* con *Aga2* (fuente: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pyd1\\_map.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pyd1_map.pdf))

La caja AGA2, que permite llevar a cabo esta estrategia, contiene junto al sitio múltiple de clonación (MCS) dos secuencias que codifican epítopos para monitorear la expresión de las proteínas de fusión (Xpress y V5).

## 1.2 Modelo de estudio: *Helicobacter pylori*

### 1.2.1 Generalidades

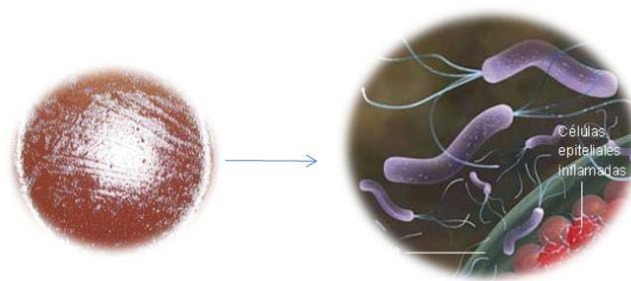
*Helicobacter pylori* es uno de los agentes infecciosos crónicos más comunes en el humano; es un bacilo espiral, Gram-negativo, microaerófilico que fue aislado por primera vez del epitelio gástrico antral en 1983 por Warren y Marshall (Ho *et al.*, 2004). Es reconocido a nivel mundial como uno de los patógenos específicos gástricos en el humano y se encuentra presente en más de la mitad de la población mundial (Michetti, 2004). La

infección por esta bacteria es la causa de la mayoría de las gastritis agudas y crónicas del tipo B, y entre un 15% y 20% de las personas con esta infección desarrollan úlcera duodenal o gástrica (Gryboski, 1999). *H. pylori* es un factor de riesgo importante para el desarrollo de adenocarcinoma, linfoma gástrico y otras enfermedades extra digestivas (Goodwin, 1997; Herrera-Goepfert *et al.*, 1996; Thieblemont *et al.*, 1995).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado a *H. pylori* como un agente carcinogénico de tipo I, hecho que ha sido previamente demostrado en modelo animal (Fujioka *et al.*, 2000).

### 1.2.2 Microbiología

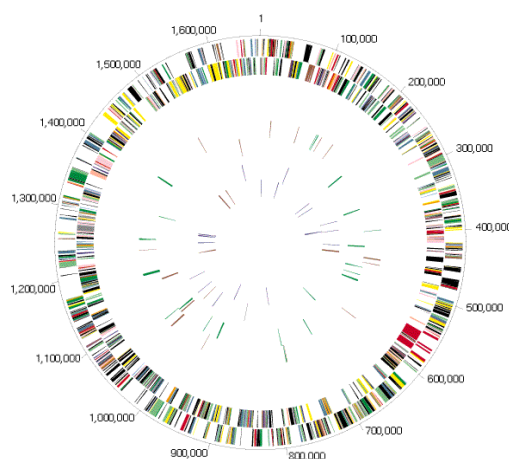
*H. pylori* es un bacilo Gram-negativo, móvil, de morfología microscópica espiral, de 2,5 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud, que crece lentamente a 37° C, en condiciones microaerofílicas y medios de cultivo con requerimientos nutricionales especiales. Posee de cuatro a seis flagelos polares, de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 4). Es catalasa, oxidasa y ureasa positivo (Versalovic *et al.*, 1999), su morfología colonial resulta característica por presentar colonias pequeñas y de aspecto brillante.



**Figura 4** . Morfología colonial y microscópica de *H. pylori*, y su representación esquemática en contacto con el epitelio gástrico (Fuente: [www.science.org.au/nobel/2005/05diagram4.htm](http://www.science.org.au/nobel/2005/05diagram4.htm)).

### 1.2.3 Genoma

La secuencia completa del genoma de *H. pylori* 26695 fue descrita por Tomb *et al.*, (1997); se obtuvo mediante secuenciación aleatoria, que previamente se había utilizado con éxito en la obtención de los genomas de *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), *Mycoplasma genitalium* (Fraser *et al.*, 1995) y *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996). El genoma de *H. pylori* mide entre 1.6 a 1.73 Mb (en promedio, 1.67 Mb); su contenido de guanina y citosina (G + C) es de 35.2 mol % ( $\pm 2.0$  mol%). En el mapa genético (Figura 5), se ha observado que los genes de *H. pylori* tienen localización variable, lo cual denota la extensa reorganización que ocurre en su genoma (Dunn *et al.*, 1997). La diversidad genética entre las cepas de diferentes poblaciones puede ser explicada por puntos de mutación y extensas substituciones, inserciones y/o deleciones, que involucran a uno o más genes y/o segmentos multigénicos. Se ha observado que entre el seis y siete por ciento de los genes son específicos para cada cepa, y casi la mitad de ellos están agrupados en una misma región hipervariable (Alm y Trust, 1999).



**Figura 5.** Representación gráfica del genoma de *H. pylori* 26695 (fuente:

<http://www.helicobacterspain.com/imagenes/rgg26695.htm>).

#### 1.2.4 Proteínas de membrana externa

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas contiene una variedad de proteínas transmembranales. Las proteínas mayoritarias son las lipoproteínas y las proteínas formadoras de canal. La lipoproteína de la mureína es la proteína más abundante en enterobacterias. Esta pequeña lipoproteína (LPS) juega fundamentalmente un papel estructural, uniendo la membrana externa con la capa de peptidoglicano (Nikaido, 2003). Las proteínas formadoras de canal, que permiten el paso de sustancias a través de esa gran barrera que representa el LPS, pueden ser agrupadas a su vez en porinas y proteínas de canal específicas de sustrato, que permite el paso de nutrientes y en algunos casos, la extrusión de productos de desecho. Las OMPs (outer membrane proteins) tipo porinas son altamente inmunogénicas, debido a sus determinantes antigénicos que se encuentran expuestos en la superficie de las bacterias. Las porinas están antigénicamente relacionadas debido a la considerable similitud que presentan en sus estructuras primaria y secundaria (Jeanteur *et al.*, 1991).

A algunas OMPs de *H. pylori* se les han atribuido propiedades como potenciales factores de adhesión como son los integrantes de la familia Hop, BabA (HopS) (Ilver *et al.*, 1998), SabA (HopP) HopZ (Peck *et al.*, 1999), AlpA (HopC) and AlpB (HopB) (Odenbreit *et al.*, 1999). Recientemente algunas proteínas con afinidad por sulfato de heparina (HSBP) han sido identificadas y propuestas en la prevención de la adhesión de *H. pylori* 25 (Ruíz-Bustos *et al.*, 2000), así como también, se ha observado la participación de la proteína HSBP-71.5 kDa en la adhesión de *H. pylori* 25 a líneas celulares de humanos HeLa S3 y Kato III. (Guzmán-Murillo *et al.*, 2001).

Por otra parte, el potencial antigénico de las OMPs de diversas especies patógenas ya ha sido demostrado. Entre algunos ejemplos se incluyen OMPs de *Pseudomonas aeruginosa*

(Gilleland *et al.*, 1988), *Salmonella typhimurium* (Matsui y Arai, 1990; Tabaraie *et al.*, 1994), *Neisseria meningitides* (Nurminen *et al.*, 1992), *Aeromona hydrophila* (Fang *et al.*, 2000) y *A. salmonicida* (Dodsworth *et al.*, 1993; Hirst y Ellis, 1994; Lutwyche *et al.*, 1995). Debido a estas características, las OMPs son consideradas como candidatos adecuados para el desarrollo de vacunas contra bacterias patógenas Gram-negativas.

### 1.2.5 Mecanismo de patogenicidad

#### 1.2.5.1 Ureasa y flagelos

El éxito de la permanencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica se debe a la capacidad que tiene para resistir el ambiente ácido que ahí prevalece, habilidad que se atribuye a la estrategia de generar su propia ureasa (Ghiara *et al.*, 1995). La actividad de esta enzima ha servido para soportar la hipótesis de que el ión hidrógeno ( $H^+$ ) induce una difusión reversa del hipoclorito y la formación de úlcera gástrica. Es relevante el hecho de que esta enzima tiene dos propiedades: i) actuar como protector del medio ácido, hacia donde la enzima es transportada con ayuda de una proteína de estrés (Hsp60) que actúa como chaperonina (Evans *et al.*, 1992), y ii) actuar a pHs óptimos (Ferrero y Lee, 1991). Evidentemente, la presencia de la enzima ureasa le permite a *H. pylori* iniciar la colonización de la mucosa gástrica (Eaton y Krakowa, 1994). Otra característica de *H. pylori* es su capacidad para desplazarse en el moco intestinal, donde los flagelos juegan un papel central (Suerbaum *et al.*, 1993); esto le permite predominar sobre la flora normal, facultad que le ayuda en la colonización del moco que reviste la superficie del intestino (Lee *et al.*, 1986). Así mismo, esta movilidad parece ser crucial para que *H. pylori*, evada la acidez gástrica y se desplace por el lumen a través del moco (Hazell *et al.*, 1986). Por lo que se ha llegado a considerar,

que tanto la presencia de flagelos como la forma misma de la bacteria juegan un papel muy importante en la virulencia de esta (Mizote *et al.*, 1997).

#### 1.2.5.2 Adhesión y colonización

Aunque solamente ha sido posible comprobar que tanto la ureasa como la movilidad son factores importantes en el proceso de colonización del huésped, *H. pylori* muestra una afinidad específica a la colonización del estómago (Lee *et al.*, 1990). Se ha encontrado que *H. pylori* tiende a colonizar de una manera específica y predominante a su huésped en la parte antral del estómago (Ho *et al.*, 2004), si nos basamos en lo que ocurre con otros patógenos gastrointestinales, el tropismo del tejido se explica por la presencia de adhesinas específicas, que son moléculas que tienen complementariedad con los receptores en el tejido para la unión de las bacterias a ligandos específicos (Ascencio *et al.*, 1993; 1995; Guzmán-Murillo *et al.*, 2001; Utt y Wadström, 1997). Se han tratado de identificar las adhesinas de *H. pylori* con base a su capacidad de aglutinar eritrocitos de diferentes especies de animales (Chmiela *et al.*, 1995; Lewala-Guruge *et al.*, 1992; O'toole *et al.*, 1995), demostrándose que *H. pylori* reconoce receptores celulares de un número considerable de especies animales (Robinson *et al.*, 1990). El número potencial de receptores que están expuestos en la superficie de las células gástricas implica que el número de adhesinas que *H. pylori* adquirió vía adaptación, es también amplio. Sin embargo, la mayoría de las interacciones con los receptores de las bacterias en la célula huésped están mediadas por carbohidratos (Ascencio *et al.*, 1993, 1995; Chmiela *et al.*, 1997; Guzmán-Murillo *et al.*, 2001; Utt y Wadström 1997; Wadström *et al.*, 1993). Trust *et al.*, (1991) demostraron que una proteína de adhesión y de hidrofobicidad, expuesta en la superficie celular, promueve la unión de *H. pylori* a laminina y colágeno tipo IV. Estudios

de adhesión *in vitro* de *H. pylori* han sido descritos empleando una variedad de líneas celulares como son: células adrenales Y1 (Evans *et al.*, 1989), células derivadas de carcinoma gástrico, Kato III (Dunn *et al.*, 1991; Guzmán-Murillo *et al.*, 2001; Guzmán-Murillo y Ascencio 2000; Guzmán-Murillo 1997; Wadström *et al.*, 1997), y células de carcinoma epitelial, HeLa S3 (Fauchere y Blaser, 1990; Guzmán-Murillo *et al.*, 2001; Guzmán-Murillo y Ascencio 2000). En éstos estudios de adhesión se confirmó que varias cepas de *H. pylori* reconocen a heparina y sulfato de heparina a pH 4-6, por lo que trabajos posteriores se han enfocado en el aislamiento e identificación de éstas proteínas.

#### 1.2.5.3 Mecanismos de acción

De manera general, *H. pylori* lleva a cabo dos mecanismos de acción:

- a) El primero es la llegada y penetración del microorganismo al moco gástrico donde se asienta y se multiplica. En esta etapa, la bacteria libera varias sustancias como enzimas y toxinas que son capaces de estimular la respuesta inmunológica local, evidenciada por un aumento de IgA secretora, con el fin de evitar el proceso de la infección. Las principales células inflamatorias participantes en este proceso inicial son los neutrófilos, que son atraídos al sitio de la lesión; de ahí que su presencia en compañía de folículos linfoides se considere como "signo de actividad" de la infección. Durante esta fase, es frecuente observar la invasión de *H. pylori* en las células epiteliales (Blaser *et al.*, 1992, Ghiara *et al.*, 1995 )
- b) El segundo mecanismo, consiste en la presentación de una respuesta inflamatoria por la interacción de linfocitos, neutrófilos, macrófagos, células mastoides y células no



inmunes, que al ser atraídas al sitio de la lesión, liberan gran variedad de mediadores químicos como: citoquinas, eicosanoides, metabolitos reactivos de oxígeno (radicales libres de oxígeno) y el sistema de complemento, que perpetúan la inflamación (Moss y Blaser, 2005). También participan los neuropéptidos liberados por las neuronas del sistema nervioso entérico, que contribuyen a ampliar la respuesta inflamatoria y aumentan los daños funcionales del estómago colonizado por *H. pylori* (Peek y Blaser, 2002).

De los mecanismos de acción de *H. pylori*, el segundo es importante en la patogénesis de la inflamación gástrica, en donde se resalta la participación del sistema inmune local y sistémico en el control de la infección y la neutralización de las toxinas bacterianas, llegando a crear una úlcera gastroduodenal.

#### 1.2.6 Terapias

En la actualidad, la forma de tratar la infección con *H. pylori* consiste en administrar lo que se conoce como terapia triple o cuádruple. En estas terapias se exige tomar uno o dos antibióticos para inhibir a la bacteria, acompañados de un supresor de la secreción de ácido y de un protector del revestimiento gástrico. Ambas terapias implican altas dosis de antibióticos durante periodos prolongados, elevando el costo del tratamiento e incrementando los efectos secundarios, aunado a esto, *H. pylori* desarrolla resistencia ante la mayoría de los antibióticos, por lo que el éxito del tratamiento tradicional varía entre un 30-95% (Bazzoli *et al.*, 1999; Harris, 1998). Además, una vez realizado el tratamiento es importante confirmar la erradicación de *H. pylori*, y ello se puede llevar a cabo realizando una prueba de aliento con urea marcada, de uno o dos meses después de finalizar el tratamiento. La negatividad de ésta o cualquier otra prueba diagnóstica (preferentemente no

invasiva), antes de este período puede resultar en falsos negativos, al haberse suprimido solo parcialmente la colonización bacteriana; este fenómeno se ha denominado aclaramiento. La serología no sirve como prueba de seguimiento ya que los títulos de anticuerpos anti IgG tardan alrededor de 6 meses en descender a la mitad de su valor inicial después de la erradicación, y ello impide confirmar la curación durante este espacio de tiempo (Wang *et al.*, 1994).

#### 1.2.6.1 *Terapias alternativas*

Debido a que aún no existe una terapia ideal que brinde el 100% de eficacia y de protección contra infecciones por *H. pylori*, en las últimas décadas, se han incrementado los estudios para tratar de encontrar alternativas al uso de los antibióticos; entre ellas se pueden mencionar:

- a) Uso de proteínas antigénicas como ureasa de la bacteria en dos subunidades (A y B), la proteína de estrés HspA (heat shock protein A) y la citotoxina Vac A) (Gómez-Duarte *et al.*, 1997; Mobley *et al.*, 2001). Este enfoque está dirigido a la búsqueda de proteínas conservadas, por lo que, se garantiza que el individuo vacunado tenga anticuerpos que respondan ante cualquier cepa de dicho microorganismo.
- b) Elaboración de vacunas orales vivas, con cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium*, que expresen antígenos externos. Este enfoque implica la búsqueda de los genes apropiados para atenuar la *Salmonella*, así como la optimización de antígenos con capacidad bactericida o protectora frente a *H. pylori* (Opazo *et al.*, 1999; Gómez-Duarte *et al.*, 1997).

- c) Uso de adhesinas (o proteínas similares) que han sido consideradas como excelentes candidatas para la elaboración de vacunas, ya que teóricamente estas proteínas actuarían contra los microorganismos estimulando inmunidad a varios niveles, dentro de los que se incluye la colonización, el bloqueo de la infección y, por tanto, prevención de la enfermedad (Wizemann *et al.*, 1999).
- d) Administración de bacterias probióticas, en donde se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas y productos de su metabolismo (como el ácido láctico, ácido acético y peróxido de hidrógeno) ejercen actividad contra *H. pylori in vitro* e *in vivo* (Yoenhee *et al.*, 1999; Micheti *et al.*, 1999).

## 2. JUSTIFICACION

*H. pylori* es considerado uno de los principales patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales los cuales pueden llegar a desembocar en cáncer gástrico por lo que el control de la enfermedad ha llegado a ser una prioridad a nivel mundial. En México su prevalencia va en aumento y aún no se cuenta con tratamientos 100% efectivos para su erradicación. Los tratamientos que actualmente se utilizan son terapias triples o cuádruples, sin embargo dosis no adecuadas o tratamientos interrumpidos permiten generar cepas resistentes. Por lo que hoy en día la búsqueda de nuevas alternativas para prevenir y/o tratar las patologías desarrolladas por la presencia de *H. pylori* es una de las prioridades en la investigación.

Estudios han demostrado que *H. pylori* posee proteínas asociadas a su superficie que le confieren afinidad y adherencia por componentes de la mucosa intestinal del hospedero. Así mismo se ha encontrado que estas proteínas que tienen reconocimiento por sulfato de heparina (HSBPs) son capaces de despertar la respuesta y de proporcionar protección inmunológica. Por lo que, la disponibilidad de herramientas moleculares y sistemas de expresión en levaduras disponibles en el mercado, nos permitirá explorar nuevas tecnologías más efectivas, seguras y económicas para desarrollar nuevas vacunas recombinantes que contribuyan en la prevención de infecciones por *H. pylori*.

Así mismo, la identificación de factores de virulencia, como lo son los factores de adhesión, servirá para la evaluación y utilización de los mismos en el desarrollo de vacunas contra éste y otros patógenos. Por lo tanto, con este estudio se pretende además de contribuir al conocimiento científico, proponer a mediano plazo nuevas alternativas para el

control de infecciones bacterianas, que repercutan positivamente en las necesidades de nuestro país.

### 3. HIPÓTESIS

*Helicobacter pylori* 25 presentará en su superficie proteínas de membrana externa no reportadas anteriormente, que participan en la adhesión y reconocimiento a componentes gástricos. Mediante la construcción de levaduras recombinantes que expresen estos genes, se podrá obtener proteínas recombinantes que conserven sus características nativas de estructura y función, las cuales podrán usarse como estrategia en la prevención anti-adhesiva de la bacteria durante el proceso infeccioso.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar antígenos de superficie de *H. pylori* 25 que reconozcan de manera específica a componentes de células epiteliales gástricas y estudiar el uso potencial de *Saccharomyces cerevisiae* para el desarrollo de vacunas orales, que expresen a estas proteínas antigénicas de membrana externa de *H. pylori*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1 Identificar y caracterizar proteínas de membrana de *H. pylori* 25 capaces de reconocer a sulfato de heparina y evaluar su participación en la adhesión a células *HeLa S3* y *Kato III*.
- 4.2.2 Clonar los genes que codifican para proteínas antigénicas de membrana (*hsbp47* y *hsbp51*) en *E. coli* DH5 $\alpha$ .
- 4.2.3 Subclonar los genes *hsbp47* y *hsbp51* en *S. cerevisiae* EBY-100 e inducir la expresión de los mismos para la producción de las proteínas recombinantes.

## 5. METODOLOGÍA

Para alcanzar los objetivos y metas planteadas en este trabajo, la estrategia metodológica se dividió en partes (complementarias), que consistieron en:

### Parte I

#### **5.1 Extracción de proteínas de membrana de *H. pylori* (HSBP47 y HSBP51) y su participación en la adherencia a células *HeLa S3* y *Kato III*.**

La primera parte del desarrollo del trabajo de investigación (Figura 6, parte I) consistió en la identificación, aislamiento y purificación de las proteínas de membrana externa (OMPs), donde únicamente elegimos a las proteínas que tuvieran reconocimiento por sulfato de heparina a las cuales llamamos (HSBPs). La extracción de proteínas de membrana se realizó siguiendo el método descrito por Doing *et al.* (1994) y para su visualización se utilizaron geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturizantes por el método de Laemmli (1970) usando el sistema Bio-Rad Mini Protean II (Bio Rad Lab.). Las proteínas OMPs se electrotransfirieron a membranas de polivinil-difluoruro (PVDF) (Millipore, Bedford), para identificar aquellas proteínas que reconocen a sulfato de heparina (HS), utilizando HS-HRP (HS marcada con peroxidasa de rábano). Las proteínas HSBP de 47, 51 y 66 kDa fueron cortadas de gel de poliacrilamida y enviadas a Stanford Protein and Nucleic acid Biotechnology Facility, para la secuenciación de péptidos internos pero con la realización previa del servicio de Mass Mapping.

Adicionalmente, la participación de las HSBP47 y HSBP51 en la adherencia e inhibición a células *HeLa S3* y *Kato III* se evaluó mediante ensayos enzimáticos siguiendo la metodología que se detalla en el Anexo I (pág 67).



## Parte II.

### 5.2 Clonación de genes *hsbp47* y *hsbp51* de *H. pylori* en *E. coli* DH5 $\alpha$ .

La segunda etapa de trabajo de investigación (Figura 6, parte II) consistió en el análisis computacional de la secuencia de péptidos internos de ambas proteínas, utilizando las bases de datos internacionales (Gen Bank, [NBCI/http://ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) y Expasy, <http://ca.expasy.org/tools/dna.html>). De las secuencias obtenidas se diseñaron varias combinaciones de oligos degenerados para llevar a cabo la amplificación parcial de los genes *hsbp47* y *hsbp51*.

La descripción detallada de los materiales y métodos utilizados (Anexo II, pág. 93) para la amplificación por PCR así como las condiciones de ligación y clonación en *E. coli* DH5 $\alpha$  se realizaron siguiendo la metodología de Sambrook, *et al* (1989).

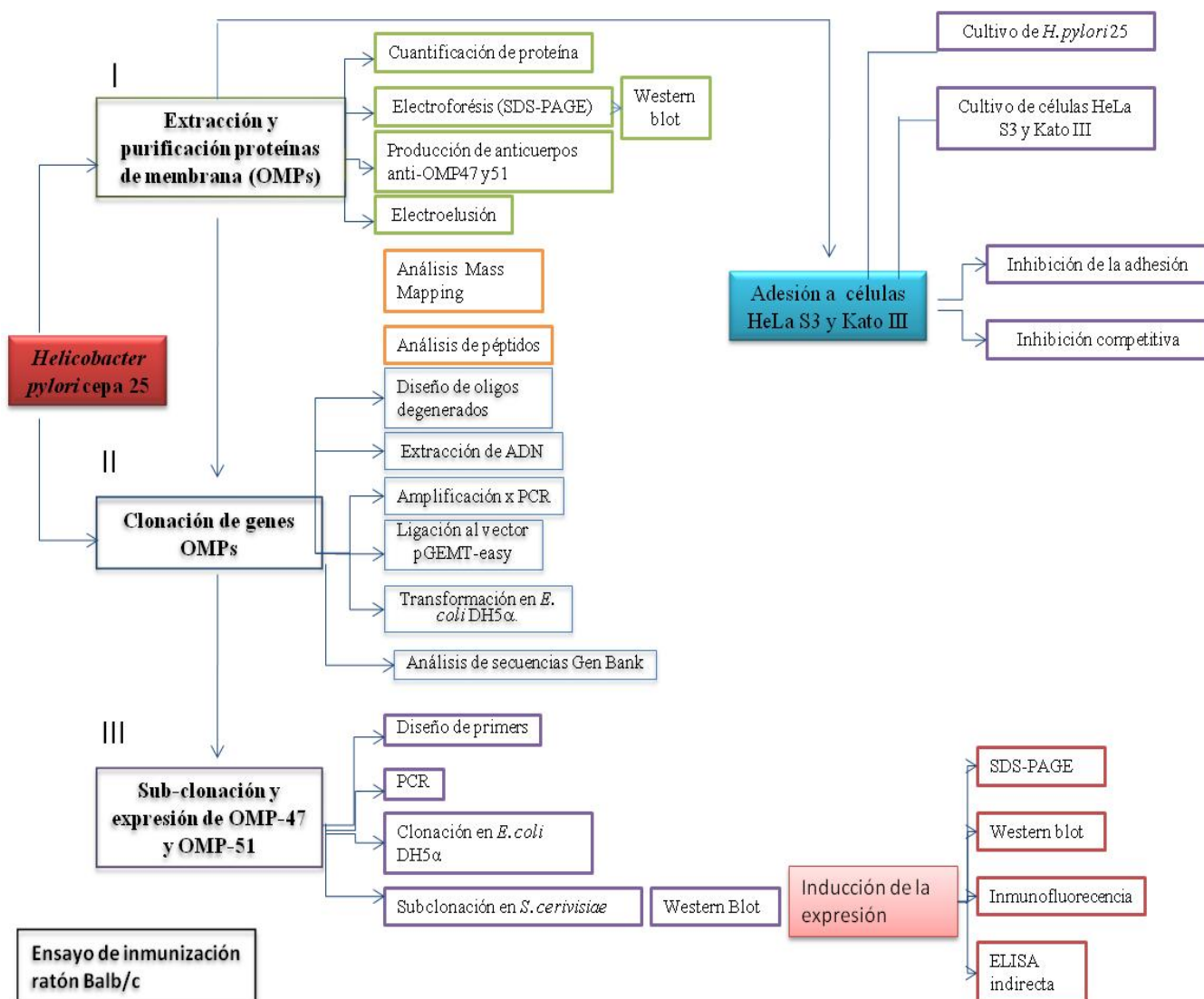
## Parte III.

### 5.3 Subclonación de genes *hsbp47* y *hsbp51* en *S. cerevisiae* y la inducción de proteínas recombinantes.

La tercera etapa del desarrollo del trabajo (Figura 6, parte III) consistió en el diseño de oligos con sitios de restricción para clonar dentro del vector de expresión pYD1 de *S. cerevisiae*. Los fragmentos génicos fueron amplificados mediante PCR y clonados en *E. coli* DH5 $\alpha$  para corroborar la secuencia y el sitio de inserción de los fragmentos génicos en el vector. A su vez, los fragmentos *hsbp47* y *hsbp51* fueron clonados en levadura *S. cerevisiae* cepa EBY-100. Las levaduras transformadas fueron seleccionadas al azar para llevar a cabo la inducción con galactosa en medio YNB-CAA, cuyo crecimiento fue monitoreado a diferentes tiempos (0, 8, 12, 24 y 36 h). Para detectar a las proteínas

recombinantes, se utilizaron técnicas como SDS-PAGE, Western blot, blotting, microscopía de fluorescencia y ELISA indirecta; la metodología se describe a detalle en el Anexo III (pág. 108).

## 5. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA



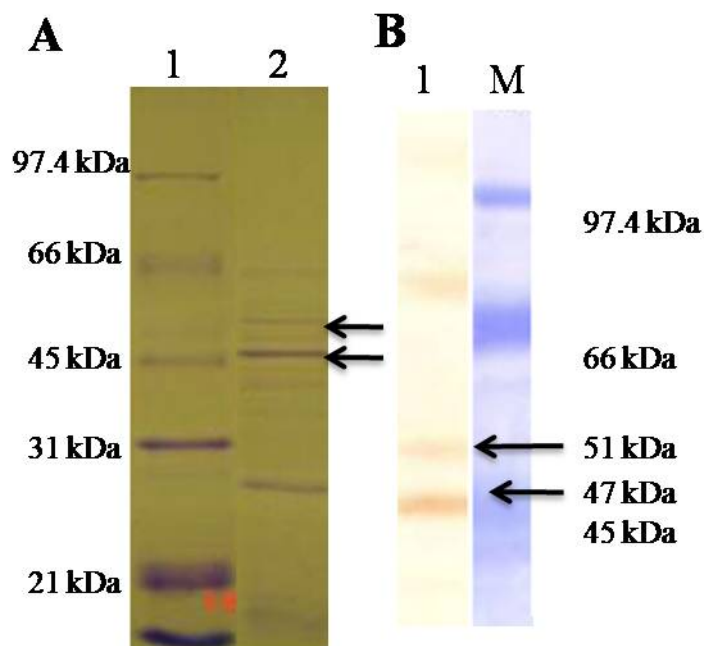
**Figura 6.** Diagrama de flujo general que muestra la metodología empleada en este estudio. **I)** Extracción y purificación de OMP's; Ensayos *in vitro* de inhibición de la adhesión por OMP's de *H.pylori* a células en cultivo; **II)** Clonación y caracterización de genes que codifican para OMP's; **III)** Subclonación de genes clonados en vector de expresión pYD1 y expresión *in vitro* mediante inducción con galactosa y evaluación de la producción de proteínas recombinantes.

## 6. RESULTADOS

### Parte I

#### 6.1 Extracción de proteínas de membrana de *H. pylori* 25 (HSBP47 y HSBP51) y su participación de en la adhesión a células *HeLa* S3y *Kato III*.

Las proteínas de membrana (OMPs) extraídas de acuerdo al método descrito por Doing *et al.* (1994), presentaron el perfil electroforético en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) mostrado en la Figura 7. En esta figura se observa que *H. pylori* 25 expresa diversas proteínas, entre las cuales se destacan las de 66.2, 47.5 y 51 kDa (Figura 7A). El análisis por western blot (Figura 7B) reveló la presencia de 3 proteínas con afinidad por sulfato de heparina (66.2, 51 y 47 kDa), lo que coincide con lo reportado por Ruíz-Bustos *et al.* (2000).

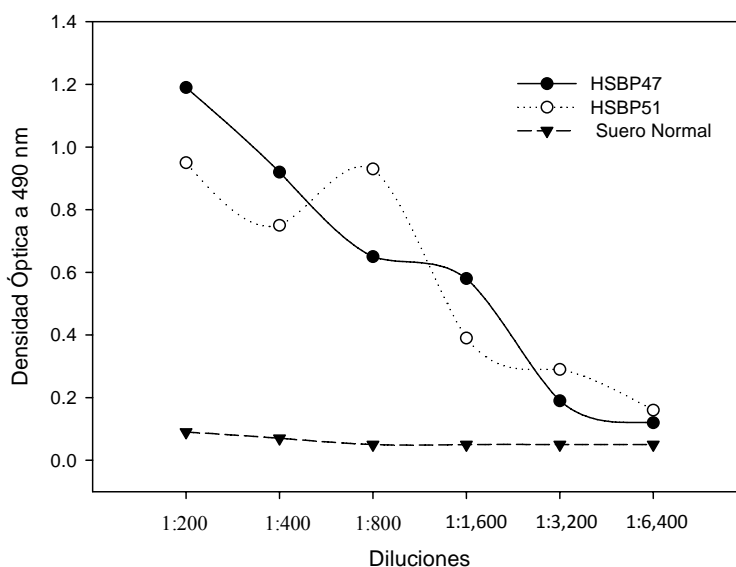


**Figura 7.** Perfil electroforético de OMP's de *H. pylori* 25. Paneles: (A) proteínas de membrana de *H. pylori* 25 resueltas en un gel desnaturalizante (SDS-PAGE) al 12%. 1) Marcador de masa molecular; 2) OMPs de *H. pylori*. (B) Western blot de OMPs con reconocimiento de sulfato de heparina resultas en geles de poliacrilamida al 12%. 1) OMPs reveladas con HS-POD. M) Marcador de masa molecular (Bio-Rad).

Las proteínas (HSBPs) con movilidad relativa (Mr) de 47, 51 y 66 kDa con afinidad por HS-POD (figura 7B), fueron purificadas mediante electroelución y corroboradas en geles de SDS-PAGE al 12% y al ser secuenciadas se obtuvieron los resultados del análisis por “Mass Mapping” de la OMP HSBP47 en donde se muestra una tendencia a la similitud con proteínas del factor de elongación TufA de *Haemophilus influenzae* (gi/16272522). Mientras que la OMP HSBP51, de acuerdo a la masa molecular, presenta similitud con proteínas hipotéticas (gi/276627741) de las que se desconoce su función. Finalmente, los resultados obtenidos para la OMP HSBP66 muestran proteínas similares al precursor de albúmina (gi/1351907). Debido a lo anterior, se seleccionaron las proteínas de Mr de 47 y 51 kDa para los análisis de secuenciación de péptidos internos.

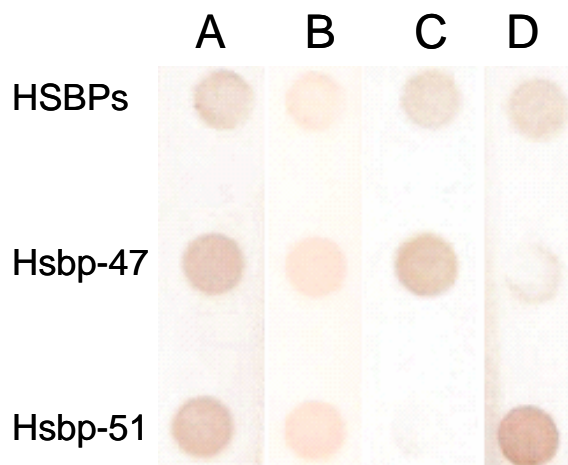
### 6.1.2 Producción de anticuerpos policlonales en ratones BALB/c

Los sueros producidos en ratones Balb/c contra las proteínas heterólogas OMP HSBP51 y OMP HSBP47 de *H. pylori* al ser analizados mediante la técnica de ELISA indirecta (Harlow y Lane, 1998), mostraron títulos de anticuerpos 1:800 para la proteína HSBP51 y 1:1600 para la proteína HSBP47, como se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Titulación de sueros hiperinmunes de ratones BALB/c por la técnica de ELISA indirecta.

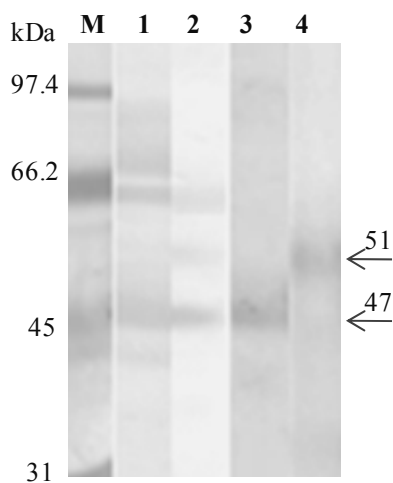
En la Figura 9, se muestran los resultados de dot blot realizados para analizar la reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales generados contra las proteínas HSBP47 y HSBP51. Es evidente que los anticuerpos policlonales producidos contra cada una de las HSBPs presentan un fuerte reconocimiento cuando se usan tanto contra extractos crudos de HSBPs como contra las mismas proteínas purificadas mediante técnicas electroforéticas (HSBP47 y HSBP51) (Figura 9. Carril A). Sin embargo, cuando se usaron los anticuerpos policlonales generados contra cada una de las proteínas purificadas la reacción de reconocimiento fue más intensa comparada con la reacción contra el extracto crudo de HSBPs (Figura 9. Carril C-D).



**Figura 9.** Dot blot de OMPs-HSBPs totales y purificadas (47 kDa y 51 kDa) bloqueadas y probadas con los sueros: **A**), anti-HSBPs totales; **B**), anti-HSBPs 47 + 51; **C**), anti-HSBP47; **D**), anti-HSBP51.

Adicionalmente, para verificar la especificidad de los anticuerpos policlonales producidos, se realizó un western blot contra sus proteínas homólogas (HSBP47 y HSBP51), resultados que se muestran en la Figura 10. En el carril 1, se puede observar que el suero anti-HSBPs

de *H. pylori* 25, reconoce varios componentes en los extractos de HSBP totales. En el carril 2, en donde se probó la mezcla de antisueros contra cada una de las HSBPs purificadas (HSBP47 y HSBP51), se puede observar que este reconocía tres componentes proteicos, de 66.2, 51, 47 kDa respectivamente. Finalmente, cuando se utilizaron por separado los sueros preparados contra cada una de las proteínas, se observa que cada uno reconoce a su proteína homóloga, HSBP47 (Figura 10. Carril 3) y HSBP51 (Figura 10. Carril 4).



**Figura 10.** Western blot de proteínas de membrana (OMPs) de *H. pylori* 25 usando sueros con diferente especificidad. Carril: **1)** anti-HSBPs; **2)** anti-HSBP47 + HSBP51; **3)** anti-HSBP47 y **4)** anti-HSBP-51. M, marcador de masa molecular.

Los resultados obtenidos del análisis de la participación de las proteínas HSBP47 y HSBP51 de *H. pylori* 25 en la adhesión *in vitro* a células epiteliales, muestran que al incubar a las células Kato III y HeLa S3 con las proteínas HSBP47, HSBP51 y una mezcla de ambas, no se presentó un efecto de inhibición competitiva contra el patógeno (Tabla I).

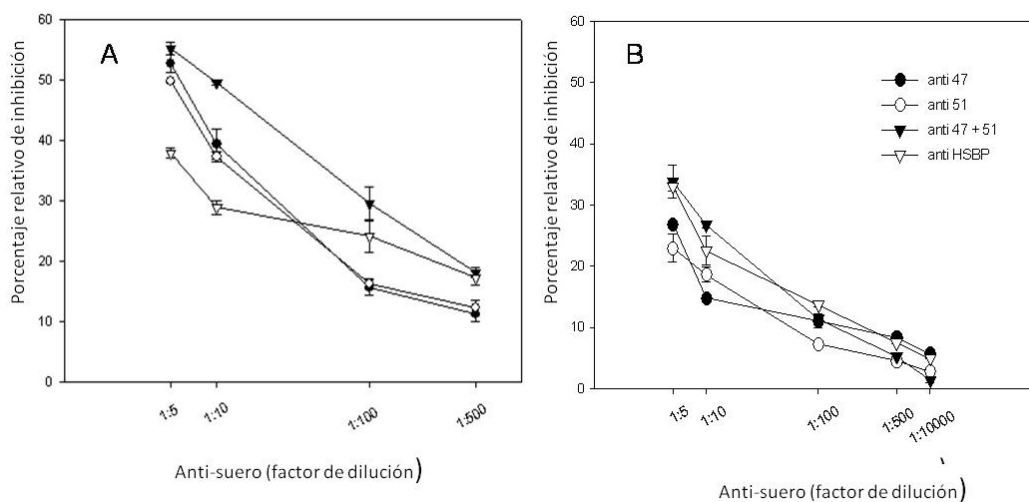
**Tabla I.** Inhibición de la adhesión de *H. pylori* 25 a células HeLa S3y Kato III con proteínas HSBPs.

Inhibidores	% Inhibición de adhesión	
	HeLa S3	Kato III
Sin inhibidor	0	0
Proteína HSBP47	0.6 ± 0.13	6 ± 0.09
Proteína HSBP51	10 ± 0.54	15 ± 0.76
Mezcla de proteínas (47 +51)	4 ± 0.69	16 ± 0.26
Extracto de OMPs	2 ± 0.11	17 ± 0.37
Proteínas HSBP totales	15 ± 1.13	27 ± 0.39

**Nota:** antes del ensayo de adhesión, las monocapas fueron tratadas con 100  $\mu$ L (75  $\mu$ g/mL/pozo) de proteína pura HSBP47, HSBP51 o una mezcla de ambas (HSBP47+HSBP51). Los resultados fueron comparados con la bacteria no tratada.

Así mismo, se pudo observar que el grado de adhesión de *H. pylori* 25 a monocapas Kato III y HeLa S3 disminuyó significativamente (respecto a los controles) cuando la bacteria fue previamente incubada con anticuerpos policlonales anti-HSBP47 y anti-HSBP51, siendo esta disminución de alrededor del 50% en células Kato III, y de entre el 23 y 28 % en células HeLa S3 (Figura 11). También, se pudo observar que al utilizar la mezcla de anticuerpos (anti-HSBP47 + anti-HSBP51) hubo un efecto sinérgico, puesto que al mezclar ambos antisueros se contribuyó a tener una mayor inhibición de la adhesión, alrededor del 55% en células Kato III y un 33% en células HeLa S3 (Figura 11).





**Figura 11.** Inhibición de la adhesión de *H. pylori* 25 a células Kato III (A) y HeLa S3 (B) con anticuerpos contra las proteínas HSBP47, HSBP51 y una mezcla de estas mismas (HSBP47 + HSBP51). Antes de la adhesión la monocapas de células fueron tratadas con anticuerpos policlonales a diferentes diluciones de sueros (1:5, 1:10, 1:100, and 1:500 por pozo); los resultados fueron comparados con la bacteria no tratada.

En el ensayo de desplazamiento de la adhesión competitiva, al incubar las células Kato III y HeLa S3 con las proteínas por separado y con una mezcla de ellas (HSBP47 + HSBP51) previamente incubadas con la bacteria, no se observó un desplazamiento significativo del patógeno en ninguno de los ensayos (Tabla II) ya que en todos los casos fue menor al 18%.

**Tabla II.** Porcentaje de desplazamiento de *H. pylori* 25 a células HeLa S3 y Kato III usando los antisueros HSBP47, HSBP51 y HSBP47 + HSBP51

Inhibidores	% de desplazamiento de bacterias adheridas			
	HeLa S3		Kato III	
	Dil 1:5	Dil 1:10	Dil 1:5	Dil 1:10
Sin inhibidor	0	0	0	0
HSBP-47 kDa	12 ± 1.14	6 ± 0.20	12 ± 2.4	0
HSBP 51 kDa	7 ± 0.39	0	17 ± 0.5	11 ± 1.2
HSBP47 + HSBP51	6 ± 0.75	4 ± 0.83	13 ± 0.70	10 ± 0.97
HSBP	5 ± 0.68	0.96 ± 0.09	7 ± 0.27	5 ± 0.83

## Parte II

### 6.2. Clonación de genes *hsbp47* y *hsbp51* de *H. pylori* 25 en *E. coli* DH5 $\alpha$ .

#### 6.2.1 Análisis de secuencias de aminoácidos de la proteína HSBP47

Los resultados obtenidos de la secuenciación de aminoácidos de péptidos internos de la proteína de 47 kDa, se muestran en la Tabla III.

**Tabla III.** Péptidos internos de la proteína HSBP47 de *H. pylori* 25.

<b>Péptido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Homología</b>
1	EHILLGR	100% Factor de elongación EF-Tu ( <i>Shigella</i> ). 100% Factor de elongación Tu [ <i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP] y 86% (EF-TU) [ <i>Helicobacter pylori</i> J99].
2	GITINTSHVEYDTPTR	100% EF-Tu de <i>Shigella flexneri</i> 2a str 2457T, 100% <i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP. 75% EF-TU de <i>Helicobacter pylori</i> J99 y 40% a una proteína hipotética de <i>Helicobacter hepaticus</i> ATCC 51449.
3	TGDEVEIVGIKDTTK	100% EF-TU de <i>Erythrobacter litoralis</i> HTCC2594], 100% EF-TU de <i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP. 78% EF-TU de <i>Helicobacter pylori</i> J99

Del análisis de las tres secuencias se pudieron observar los siguientes puntos: que los tres péptidos mostraron un 100% de homología con el factor de elongación EF-tu de *Haemophilus influenzae*; mientras que con *H. pylori* 25, la misma proteína presenta un 80% de homología. Por lo tanto, las secuencias de los péptidos (Tabla III) y la secuencia de aminoácidos reportada para *H. pylori* 25 (Figura 12), fueron tomadas como base para el diseño de oligos degenerados (Tabla IV) a utilizarse en las amplificaciones mediante PCR.

---

**Factor de elongación TU (EF-TU) *Helicobacter pylori* J99**

(gi|15612193|ref|NP\_223846.1||15612193)

---

**MAKEKFN**RRTNPHVNIGTIGHVYHGKTTLSAAISAVLSLKGLAEMKDYDNIDNAPQEKERGITIATSHI  
 EYETET**TR**HYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVSAAADGMPQ**TREHILLSRQVG**VPHIVVF  
 LNKQDMVDDQELLELVEMEVRELLSAYEFPGDDTPIVAGSALRALEEAKAGNVGEWGEKVLK**LM**A  
 EVDSYIPTPERDTEK**TFLMPVEDVFSI**AGRGT**VVTGRIERG**VVKV**GDEVEIVGIRATQKTTVTG**VEM  
 FRKELEKGEAGDNVGVLLRGTKKEEVERGMVLCKPGSITPHKKFEEIYVLSKEEGGRHTPF**FTNY**  
 RPQFYVRTTDVTGSITLPEGVEMVMPGD**NVKITVELIS**PVALELGTKFAIREGGRTVGAGVVSNIIE

---

**Figura 12.** Diseño de oligos degenerados para la amplificación del gen *hsbp47*, con base en las secuencias menos degeneradas (sombreadas), teniendo como base la tabla de uso de codones de *H. pylori* J99 y 26695 reportadas en el banco de datos del GenBank.

**Tabla IV.** Secuencia de los oligos diseñados a partir de péptidos internos de la proteína HSBP47 de *H. pylori* 25.

<b>Péptido</b>	<b>Oligo</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>	<b>Tm</b>
MAKEKFN	FHP47A	5'-GGC(A/T/C)AAAGAAAA(A/G)TTTAA(C/T)AG-3'	51.3
GDEVEIVGI	FHP47B	5'- GG(A/C/G/T)GATGAAGTGGAAAT(C/T)G -3	57.8
GDEVEIVGI	RHP47C	5'- C(A/G)ATTTCCACTTCATC(A/T/G/C)CC -3'	53.6
VKITVELIS	RHP47D	5'- CAA(C/T)TC(A/C)AC(G/A/T)GT(A/G)ATTTT(A/C)AC-3'	47.6

### 6.2.2 Análisis de secuencias de aminoácidos de la proteína HSBP-51

Los resultados obtenidos de la secuenciación de aminoácidos de péptidos internos de la proteína 51 kDa, se muestran en la Tabla V.

**Tabla V.** Péptidos internos de la proteína HSBP51 de *H. pylori* 25.

Péptido	Secuencia	Homología
1	FKPENDDYSIAKR	70% Proteína hipotética (FG00284.1) de <i>Gibberella zeae</i> PH-1; 60% Proteína hipotética (IP 32953) de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ; 70% Proteína hipotética (jhp0191) de <i>Helicobacter pylori</i> J99.
2	GSDNAAFFSANSVQKPK	100% Proteína desconocida (DUF877) de <i>Geobacter metallireducens</i> GS-15; 100% proteína hipotética (YPTB3637) de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ; 58% proteína hipotética de <i>H. pylori</i> J99 y 58% proteína putativa de <i>H.pylori</i> J99 (AE001473.1).
3	LPYDPVENPVR	67% Proteína desconocida (AF335466) de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (IP 32953); 67% Proteína hipotética jhp0401 de <i>H. pylori</i> J99 (AAD05984.1).

Al hacer el análisis de las tres secuencias, se pudo observar que: los tres péptidos mostraron homología con una proteína hipotética de *Yersinia pseudotuberculosis* (IP 32953) y con una proteína hipotética de *H. pylori* J99 (AE001473.1). Por lo tanto, las secuencias de los péptidos (Tabla V) y la secuencia de aminoácidos reportada para *Y. pseudotuberculosis* (Figura 13), fueron tomadas como base para el diseño de oligos degenerados (Tabla VI) a utilizarse en las amplificaciones mediante PCR.

**Proteína hipotética YPTB3637 de *Yersinia pseudotuberculosis*  
(gi:51597928)**

**MPLHEENTV**LAEPASATFLLDEIMSQTRMAP**GN**GDY**DI**AKQGVAAFISSILDTGTNEEPINKLLVD  
 RMIIELDKKLSAQMDEILHANEFREIESSWRSLKLLVDRTDFRENIKINIMHATKEELLEDFEFSPEII  
 QSGFYKHVYSSGYGQFGGEPTAAIIGNYAFNNSSPDMKLLQYVSAVGAMAHAPFLSSVAPDFFGI  
 SSFTELPAIKDLKSVFEGPAHTKWRALRESEDSRYLGLTTPRFL**RLPYSTVEN**PIKFNFNYYEDVS  
 RNHEHFLWGNTAFLASCLTDSFAKYRWCPNIIGPQSGGTVHDLPVHLYEAMGQIQAKIPTEVLIT  
 DRREFELAEFGFITLTM**RK****GSDNA****AFFSANSVQKPK**VFPNTREGKMAETNYKLGTLQPYMFIINRL  
 AHYIKVLQREQIGSWKERQDLERELNIWLKQYIADQENPPTDVR**SR**RPL**RS**AQIQVLDVEGDPGW  
 YQVAMQVRPHFKYMG**AS**F**EL**SLV**GRLDKE**

**Figura 13.** Diseño de oligos degenerados para la amplificación del gen *hsbp51*, basado en las secuencias menos degeneradas (sombreadas), considerando la tabla de uso de codones de *H. pylori* J99 y 26695, reportadas en el GenBank.

**Tabla VI.** Secuencia de nucleótidos de los oligos diseñados a partir de péptidos internos de la proteína de HSBP51 kDa de *H. pylori* 25.

Péptido	Oligo	Secuencia (5'→3')	Tm
MPLHEENTV	FHP51A	5'-CCTTT(G/A/T)CA(C/T)GAAGA(A/G)AATAC-3'	50.3
PENDDYSIA	FHP51B	5'-GAAAATGATGACTATAGCATT-3'	52.5
DNAAFFSANSVQ	FHP51C	5'-GATAA(C/T)GC(C/T)GC(A/T/C)TT(C/T)TTTAG-3'	53.5
DNAAFFSANSVQ	RHP51D	5'-CTAAA(A/G)AA(G/A/T)GC(A/G)GC(A/G)TTATC -3'	51
SFELSLVGRDLKE	RHP51E	5'-CCCAC(A/T/C)A(A/G)(A/T)GA(A/C/T/G)AGCTC -3'	49.6

### 6.2.3 Amplificación de fragmentos génicos *hsbp47* y *hsbp51* por PCR

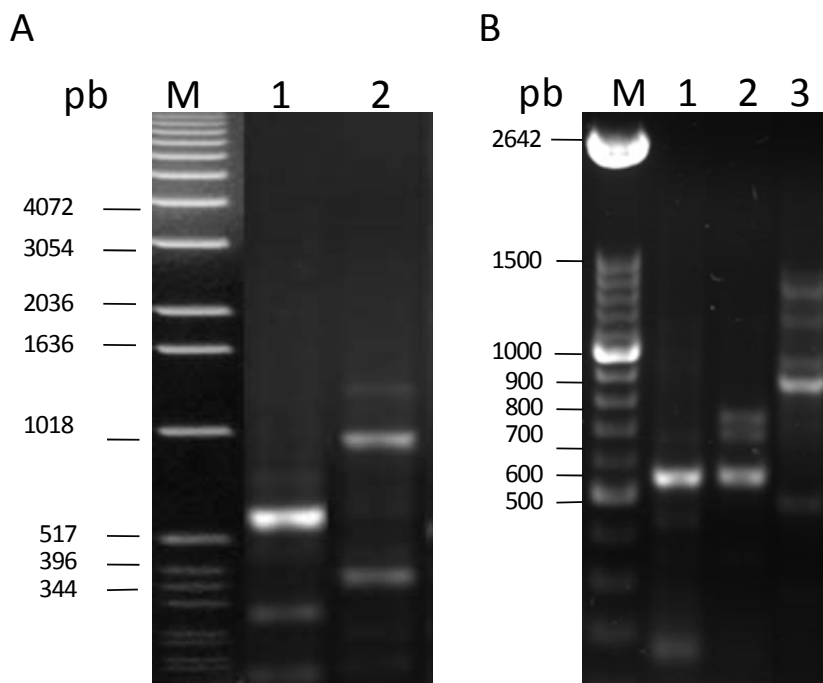
Para la amplificación de regiones parciales de los genes *hsbp47* y *hsbp51*, mediante PCR, se utilizaron las combinaciones de oligonucleótidos mostradas en la Tabla VII.

**Tabla VII.** Combinación de oligos para la amplificación de fragmentos *hsbp47* y *hsbp51*.

Combinación Oligos	Tm	Tamaño fragmento (pb)
<b>HSBP47</b>		
FHP47A-RHP47C	51.3-53.4	750
FHP47A-RHP47D	51.3-47.6	1100
FH47B-RHP47D	57.8-47.6	360
<b>HSBP51</b>		
FHP51A-RHP51D	50.3-51	1100
FHP51A-RHP51E	50.3-49.6	1470
FHP51B-RHP51D	52.5-51	990
FHP51B-RHP51E	52.5-49.6	1380
FHP51C-RHP51E	53.5-49.6	390

Se obtuvieron dos productos de amplificación específicos para *hsbp47* que se muestran en la Figura 14A, uno de ~ 700 pb y otro de 1 kb, los cuales fueron clonados en el plásmido pGemT-easy y determinada su secuencia de nucleótidos. Para el gen *hsbp51*, se

obtuvo una serie de amplicones de diferentes tamaños (Figura 14B); el amplicon de ~ 950 pb se clonó en el vector pGEM-T y se determinó su secuencia de nucleótidos.



**Figura 14.** Gel de agarosa TAE al 1%; teñido con EtBr. Productos de amplificación, mediante PCR, de los genes *hspb* usando varias combinaciones de oligonucleotidos degenerados. Panel (A), *hspb47* con 2 combinaciones de oligonucleótidos; panel (B) *hspb51* con 3 combinaciones de oligonucleótidos carril: M) marcador de masa molecular; carril A1) FHP47A- RHP47C; carril A2) combinación FHP47A-RHP47D; carril B1) FHP51A- RHP51D; carril B2) FHP51B-RHP51D; carril B3) FHP51B-RHP51E.

Los resultados obtenidos del fragmento secuenciado *hspb47* de acuerdo al análisis genómico (Gen Bank, SwissProt y EMBL) reveló que la secuencia tiene un 96% de similitud con el factor de elongación EF-Tu de *H. influenzae* Rd KW20 (NP\_438736.1) así como un 96% de identidad con proteína hipotética de *Haemophilus* CGSHiR3021\_10860 (gb|EDK15003.1). Sin embargo, con factor de elongación EF-Tu, NP\_223846.1 de *H. pylori* J99 solo se observó un 60% de identidad, y un 40% con una proteína hipotética de *H. pylori* jhp0432 (NP\_223150.1).

Por otro lado los resultados obtenidos del análisis genómico de los fragmentos *hsbp51*, revelan una similitud del 67% con proteína hipotética de *Y. pseudotuberculosis* (IP 32953) y 40% con proteína hipotética de *H. pylori* J99 (AAD05984.1).

### Parte III

#### 6.3. Subclonación de genes *hsbp47* y *hsbp51* en *S. cerevisiae* e inducción de proteínas recombinantes.

La subclonación de los fragmentos parciales de los genes *hsbp47* y *hsbp51* mediante compatibilidad con enzimas de restricción para liberar los fragmentos del vector pGEMT-easy y linearizar el vector de subclonación pYD1, la enzima *EcoRI* resultó ser la primera elección, sin embargo, con el uso de esta enzima, no fue posible la inserción de los fragmentos en el vector de expresión, por lo que posteriormente se optó por una ruta alterna, que consistió en el diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de estos genes incorporando los sitios de restricción 5'-*EcoRI*- y *XhoI*- 3' (Tabla VIII), incluidos en el sitio múltiple de clonación de pYD1.

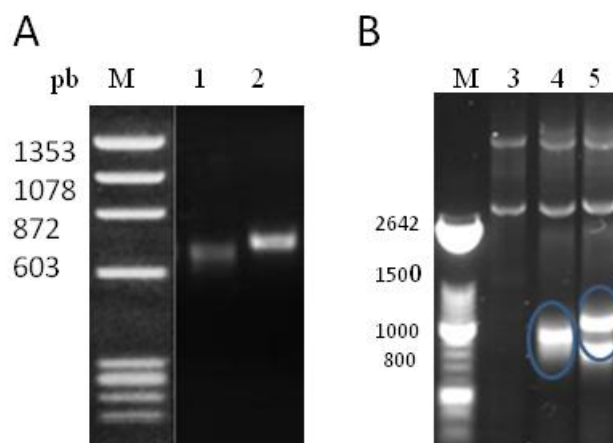
**Tabla VIII** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes *hsbp47* y *hsbp51* y clonación en el vector de expresión pYD1.

Primer	Secuencia	Sitio de restricción
HP47AF	5'GCG <b>AATT</b> C GGCAAAAGAAAAGTTTAATAG 3'	<i>EcoRI</i>
HP47CR	5'AGTC <b>TCGA</b> GCGATTTCCTTCATCACC 3'	<i>XhoI</i>
HP51BF	5'GCG <b>AATT</b> CGAAAATGATGACTATAGCATT 3'	<i>EcoRI</i>
HP51DR	5'AGTC <b>TCGA</b> GCTAAARAADGCRGCRTTATC 3'	<i>XhoI</i>

Nota: en negritas denotan los sitios de restricción insertados a cada uno de los oligos.

Con las combinaciones correspondientes se amplificaron las regiones génicas que codifican las proteínas HSBP47 y HSBP51 (Figura 15A). Los amplicones obtenidos se ligaron al vector de expresión pYD1 (previamente linearizado con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*); de esta manera, se generaron las construcciones en el vector pYD1: pYD1/*hsbp47* y pYD1/*hsbp51* (Figura 15B).





**Figura 15.** Gel de agarosa TAE al 1%, teñido con EtBr. Clonación de los fragmentos génicos de *hsbp* de *H. pylori* 25 en pYD1. Panel **A**: amplicones de *hsbp47* (A1, 750 pb) y *hsbp51* (A2, 800 pb); M, marcador de masa molecular. Panel **B**: B3, pYD1, control negativo, construcciones pYD1/*hsbp47* (B4) pYD1/*hsbp51* (B5).

Estas construcciones fueron transformadas en células competentes de *E. coli* Top10, posteriormente se aislaron y purificaron de las bacterias para la secuenciación de los insertos, antes de su transformación en células de levadura. Su identidad, fue confirmada mediante análisis de alineamiento con las secuencias de nucleótidos obtenidas anteriormente.

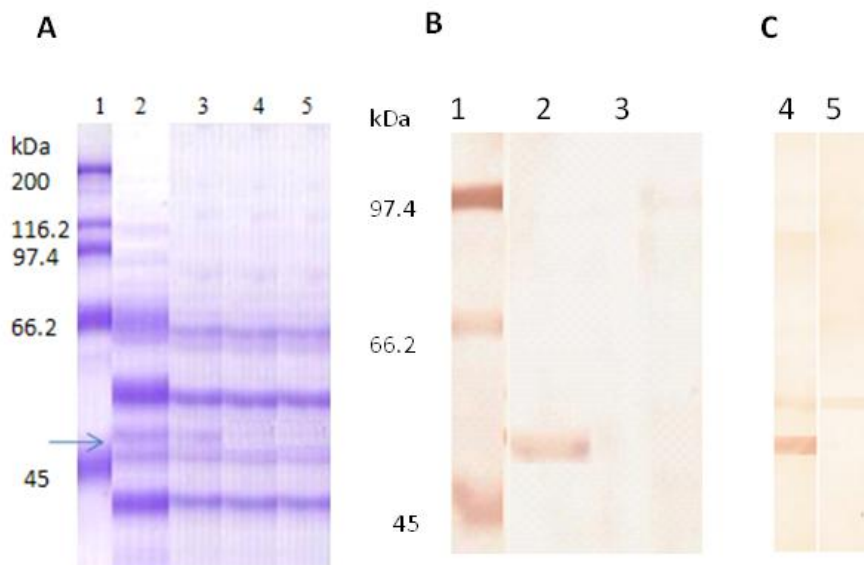
Células competentes de *S. cerevisiae* EBY100 fueron transformadas con los plásmidos purificados (pYD1-control negativo-, pYD1/*hsbp47* y pYD1/*hsbp51*) para la expresión de proteínas heterólogas. Al seleccionar los transformantes en medio SD-CAA, se obtuvieron más de 100 colonias que fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### **6.3.1 Inducción de la expresión de proteínas HSBP47 y HSBP51 en superficie de levadura *S. cerevisiae* EBY- 100.**

Al analizar la expresión *in vivo* en *S. cerevisiae* EBY100 de las construcciones *S.c*-pYD1/*hsbp47* y *S.c*- pYD1/*hsbp51*, la expresión fue solamente detectada en los tiempos 8, 12 y 24 horas, no siendo posible detectarla de 0 a 6 horas ni después de las 24 horas en las que se monitoreó.

### **6.3.2 Detección de proteínas heterólogas mediante técnicas electroforéticas.**

Para determinar la presencia de las proteínas recombinantes, las proteínas de membrana externa (OMP's) se recuperaron siguiendo las recomendaciones del fabricante, mediante el uso de ditioneitol (DTT). En el caso de los recombinantes con la construcción *S.c*/pYD1-*hsbp47*, el análisis electroforético de las fracciones recuperadas reveló a las 12 y 24 h de inducción, la presencia de una proteína con una Mr de 50 kDa que no aparece en los controles negativos (Figura 16A). Por medio de Western blot se confirmó la presencia de una proteína de Mr 50 kDa detectada con el suero anti-HSBP47 a las 12 h a diferencia del control de levadura EBY100/pYD1 (Figura 16B). Al mismo tiempo, se realizó otra transferencia a membrana la cual fue revelada con sulfato de heparina ligado a peroxidasa de rábano (HS-HRP) (Figura 16C). Los resultados confirmaron una banda intensa de Mr 50 kDa, lo que indica que se trata de la proteína recombinante Aga2-HSBP47, y que esta proteína conserva la propiedad de reconocer a sulfato de heparina.



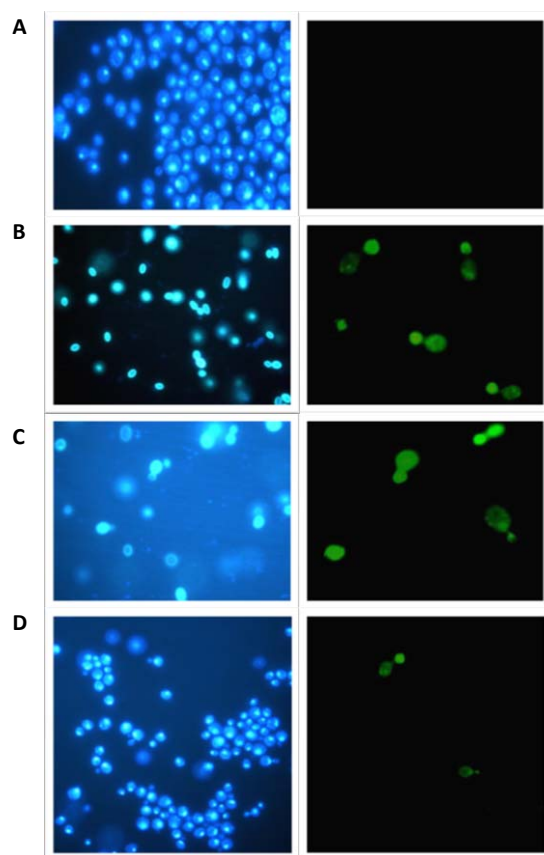
**Figura 16.** Análisis electroforético de OMPs de *S. cerevisiae* EBY100 extraídas con DTT. Panel **A**), Gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE), teñido con CBB. Panel **A**: **1**) marcador de masa molecular kDa; **2**) extracto de proteínas de membrana (Aga2-HSBP47) a 12 h; **3**) extracto de proteínas (Aga2-HSBP47) a 24 h; **4**) extracto de proteína de membrana (Aga2-HSBP47) sin inducir; **5**) extracto de proteína Sc/pYD1 inducida. Panel **B**) Western blot revelado con anti-HSBP47, **1**) marcador de masa molecular kDa; **2**) Aga2-HSBP47 a 12 h; **B3**), *S.c* /pYD1 (control); Panel **C**) Electrotransferencia revelado con HS-HRP. **4**) Aga2-HSBP47 a 12 h; **5**) *S.c*/pYD1 (control).

Por otro lado, la proteína recombinante Aga2-HSBP51, no fue detectada (datos no mostrados) ni en los perfiles electroforéticos de proteínas mediante western blot.

### 6.3.3 Detección de proteínas recombinantes por medio de la técnica de microscopía de fluorescencia.

Con el uso de anticuerpos policlonales contra las proteínas HSBP47 y HSBP51 como primer anticuerpo y como segundo anticuerpo fragmentos FAB anti-ratón marcados con fluoresceína, encontramos que la expresión de la proteína Aga2-HSBP47 en *S.*

*ceverisiae* EBY100 fue baja (Figura 17), observándose un 30% de levaduras con fluorescencia a las 12 h (Figura 17B), y un 25% de levaduras fluorescentes a las 24 horas (Figura 17C). Por otra parte, la expresión de la construcción pYD1/*hsbp51*, solo fue evidente el 2% de levaduras fluorescentes a las 12 h de inducción (Figura 17D).

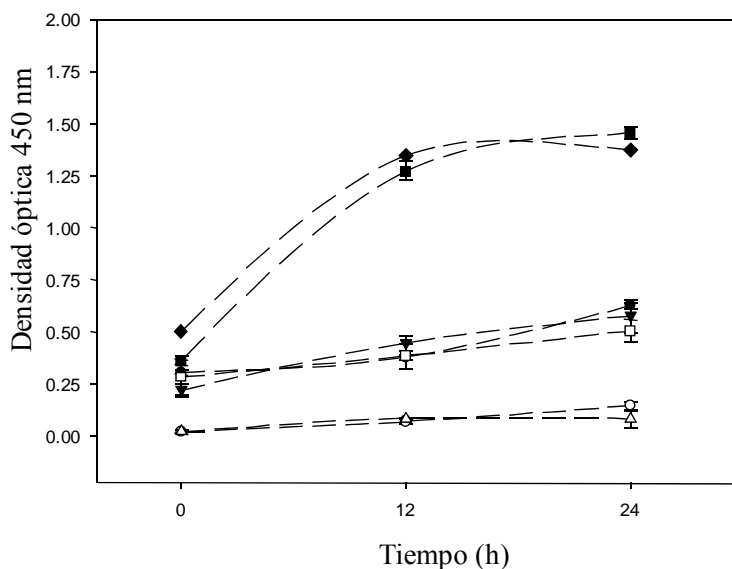


**Figura 17.** Microscopía de fluorescencia para la detección de la producción de OMP's recombinantes en *S. cerevisiae* EBY100. Columnas: izquierda tinción DAPI (azul); columna derecha marca con fluoresceína (verde). Paneles: **A)** *S. cerevisiae*/pYD1 (control negativo); **B)** *S.c*/pYD1-*hsbp47* (12 h); **C)** *S.c*/pYD1-*hsbp47* (24 h); **D)** *S.c*/pYD1-*hsbp51* (12 h). Aumento: 100X.

#### 6.3.4 Detección de proteínas recombinantes por medio de la técnica de ELISA indirecta.

En la expresión y detección de la proteína recombinante Aga2-HSBP47 por el método de ELISA indirecta se pudo observar cómo se muestra en la Figura 18, que los

anticuerpo policlonales anti-HSBP47 presentaron una sensibilidad significativa ( $P < 0.05$ ) del 51% y 53.7% a las 12 y 24 horas respectivamente, con el extracto de proteína recombinante Aga2-HSBP47 (■). El mismo patrón fue observado cuando se utilizó la construcción completa de levadura inducida *S.c/Aga2-HSBP47* (◆), a diferencia de los controles más representativos utilizados: ( $\Delta$ ) *S.c/pYD1* inducido probado con suero de ratón sin tratamiento (control negativo) y ( $\square$ ) *S.c/pYD1-Aga2-HSBP47*, muestra no inducida probada con suero anti-HSBP47. Además, se probaron los clásicos controles como cepa de levadura *S. cerevisiae* con suero anti-HSBP47 ( $\bullet$ ), *S.c/pYD1* con suero anti-HSBP47 ( $\blacktriangledown$ ), los cuales tuvieron el mismo patrón de detección con el suero anti-HSBP47 (Figura 18).



**Figura 18.** ELISA indirecta para la detección de proteína recombinante Aga2-HSBP47. Controles negativos con suero normal de ratón ( $\Delta$ ) *S.c/pYD1* y ( $\circ$ ) *S.c/pYD1-hsbp47*. Controles internos con suero anti-HSBP47 ( $\square$ ) *S.c/pYD1-hsbp47* (no inducida), ( $\bullet$ ) *S.c* ( $\blacktriangledown$ ) *S.c/pYD1*, muestras corridas: extracto de proteína recombinante Aga2-HSBP47 ( $\blacksquare$ ), levadura inducida *S.c/Aga2-HSBP47* ( $\blacklozenge$ ).

### 6.3.5 Análisis bioinformático de construcción pYD1/*hsbp47* y pYD1/*hsbp51*

En el análisis BLAST de la secuencia de nucleótidos de la construcción pYD1/*hsbp47*, se obtuvo un 88% de identidad con el factor de elongación EF-tu de *H. influenzae* 86-028NP y un 76% de identidad con ésta misma proteína de *H. pylori* J99, en la que se observa que dos péptidos internos de HSBP47 (Tabla III), se localizan en la secuencia de aminoácidos deducida (209 residuos de aminoácidos, Figura 19); lo que confirma que los amplicones corresponden a una región del gen *hsbp47*.

---

```

gacagtattggcaaaacactacggtggtgcggtcgtgcatttgaccaaactcgataacgcg
T V L A K H Y G G A A R A F D Q I D N A
ccggaagaaaaagcgcggtggtattaccatcaatacttcacacggtgaatacgatacacca
P E E K A R G I T I N T S H V E Y D T P
accggtcactacgcacacggtgactgtccgggacacgccgactacgttaaaaacatgatt
T R H Y A H V D C P G H A D Y V K N M I
accggtgcggcacaaatggacggtgcaatcttagtggtgcgggcactgacggtcctatg
T G A A Q M D G A I L V V A A T D G P M
ccacaaactcgtgagcacatcttattaggtcgccaagtaggtgtaccttacatcatcgta
P Q T R E H I L L G R Q V G V P Y I I V
ttcttaacaaatgcgatatggttgatgacgaagagttattagaattagtcgaaatggaa
F L N K C D M V D D E E L L E L V E M E
gttcgtgaacttcttctcaatatgacttcccgggtgatgacacccaatcgtacgtggt
V R E L L S Q Y D F P G D D T P I V R G
tcagcattaaaagcgttagaaggcgatgcgggcatgggaagaaaaaatccttgaattagca
S A L K A L E G D A A W E E K I L E L A
aaccacttagatacttatacccggaacctgaacgtgcaattgaccaatcgttccttctt
N H L D T Y I P E P E R A I D Q S F L L
ccaattgaagacgtggttctcaatctcaggtcgtggtacggttagtaaccggtcgtgtagag
P I E D V F S I S G R G T V V T G R V E
cgtggtatcatccgtacaggagatgaagt
R G I I R T G D E

```

---

**Figura 19.** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de un fragmento de gen *hsbp47* de *H. pylori*.<sup>25</sup> Los péptidos obtenidos para la proteína HSBP47 se encuentran resaltados con letras itálicas en negritas. La secuencia de aminoácidos subrayada corresponde al dominio conservado GTP-EF-Tu.

La predicción de regiones transmembranales, se obtuvo mediante paquetes disponibles en ExPASy (Expert protein Analysis System, <http://www.expasy.org>) (Bairoch, *et al.*, 2003) y

TMHMM (<http://www.Cbs.dtu.dk/servicies/TMHMM-2.0/>), con lo que fue posible predecir la orientación y el tipo de estructuras secundarias mediante modelos matemáticos sofisticados (Krogh, *et al.*, 2001), por lo que el análisis de la secuencia permitió determinar y predecir la ubicación de la proteína HSBP47 dentro de la célula. Dado que a la fecha no contamos con la secuencia completa del gen (extremos amino- y carboxilo-terminal), el análisis indicó que la fracción clonada de la proteína HSBP47 se ubica al exterior de la célula (datos no mostrados).

El análisis Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) de la secuencia *hsbp47* (Figura 20) que identifica dominios y familias proteicas comunes, basándose en una amplia colección de alineamientos múltiples de secuencias y modelos ocultos de Harkov, reveló un dominio conservado GTP-EF-TU (Figura 20) que consta de 16 aminoácidos, localizados en el sitio amino 18-33 (negritas subrayadas, Figura 19).



**Figura 20.** Representación esquemática del dominio GTP-EF-TU, localizado del aminoácido 18 al 33 de la secuencia de aminoácidos deducida del fragmento parcial del gen *hsbp47*.

Los mismos análisis aplicados a la secuencia de nucleótidos pYD1-*hsbp51* (y su traducción a aminoácidos) no revelaron la presencia de ninguno de los péptidos internos obtenido a partir de la proteína purificada (Tabla V) en los 6 marcos de lectura abierta posibles, que sugirieran la identidad de la proteína como HSBP51. Por lo tanto, es necesario realizar análisis de secuencia adicionales para la nueva construcción recombinantes pYD1/*hsbp51*.

#### 6.4 Resumen de Resultados

- Se obtuvieron 3 péptidos específicos para la proteína HSBP47 cuyas secuencias fueron similares a la proteína EF-Tu de *H. influenzae* (NP\_438736.1) y una similitud del 60% para *H. pylori* J99.
- Se obtuvieron 3 péptidos específicos para la proteína HSBP51 los cuales fueron similares a una proteína putativa de *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 y con una proteína hipotética de *H. pylori* J99 (AADO59841).
- Se obtuvo un fragmento parcial del gen *hsbp47* clonado en el vector pYD1, el cual consiste de 674 pares de bases que codifica para una fracción de proteína de 209 aminoácidos.
- El gen que codifica para la proteína HSBP47 aparte de tener la propiedad de reconocer a sulfato de heparina tiene un dominio conservado EF-Tu de 16 residuos.
- Los resultados en los ensayos de adhesión han demostrado que estas proteínas participan en la adhesión de *H. pylori* 25 a líneas celulares de mamífero HeLa S3 y Kato III y que anticuerpos policlonales contra estas proteínas (HSBP-47 y 51 kDa) pueden inhibir el proceso de adhesión.
- Se detectó la proteína recombinante Aga2-HSBP47 tanto en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) como mediante western blot utilizando para ello anticuerpo policlonal anti-HSBP47; además ésta proteína conserva su propiedad de reconocer a sulfato de heparina (HS) debido a su reconocimiento de manera específica utilizando sulfato de heparina marcada con peroxidasa.
- Se obtuvo una producción significativa de proteína recombinante Aga2-HSBP47 por la técnica de ELISA indirecta, siendo ésta la técnica más sensible para su identificación.



- El análisis parcial de la secuencia de la proteína recombinante HSBP47 indican que se trata de una proteína considerada dentro de las 10 proteínas más antigénicas de *H. pylori*, además su característica física de reconocer a sulfato de heparina como factor de adhesión la convierten en ser considerada como una proteína con alto potencial en el diseño de vacunas recombinantes.

## 7. DISCUSIÓN

La adhesión y la colonización son considerados prerrequisitos para el desarrollo de una patogénesis microbiana. Algunas bacterias patógenas cuentan con una gran variedad de mecanismos que les permiten adherirse a células epiteliales del hospedero o a sus componentes asociados, para eventualmente colonizarlos y causar la infección (Ofek y Doyle, 1994). Debido a que la adhesión es uno de los primeros procesos de patogenicidad, se vuelve necesario el tratar de entender estos mecanismos de interacción patógeno-hospedero.

Se ha demostrado que *H. pylori* reconoce componentes de la membrana basal *in vitro* (Ascencio *et al.*, 1993; 1995) y que además expresa moléculas de naturaleza proteica que son capaces de reconocer a glicoconjugados sulfatados en el huésped (Ascencio *et al.*, 1995; Ljungh *et al.*, 1996). Dichos componentes han sido identificados, denominándose proteínas enlazantes de sulfato de heparina o HSBPs. Estudios previos demostraron una HSBP de *H. pylori* 25 (HSBP71.5, de 71.5 kDa) juega un papel importante en la adhesión a líneas celulares de mamífero *HeLa S3* y *Kato III* (Guzmán-Murillo *et al.*, 2001). Adicionalmente, proteínas de membrana externa como BabA, SabA, AlpA, AlpB y HopZ, pueden mediar la adhesión de *H. pylori* a células epiteliales gástricas (Scott-Algood *et al.*, 2006). Sin embargo, es necesaria la caracterización de otras proteínas en cepas de *H. pylori*, que nos permitan describir de forma completa, la participación de proteínas de membrana en dichos mecanismos de adhesión y que puedan utilizarse en un futuro cercano, como antígenos para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

Durante el presente trabajo, se identificó a tres proteínas de membrana externa (OMP) de peso molecular relativo de 47.2, 51 y 66 kDa (HSBP47, HSBP51 y HSBP66), que reconocen específicamente a sulfato de heparina. Estas proteínas se encontraron en la fracción OMP y en menor cantidad en la fracción extracelular, indicando que dichas proteínas podrían estar siendo expulsadas al medio durante la fase logarítmica de crecimiento, aunque una mayor cantidad de las mismas siguen estando asociadas a la membrana. Se ha reconocido, que las proteínas que son secretadas al medio, podrían jugar un papel importante en las interacciones patógeno-hospedero en *H. pylori* (Bumann *et al.*, 2002), por tanto es necesario confirmar si estas adhesinas son secretadas en alguna fase de crecimiento de esta cepa.

Por otro lado, anticuerpos policlonales anti- HSBP47 y HSBP51 producidos en ratón, inhibieron significativamente la adhesión de *H. pylori* 25 a células epiteliales HeLa S3 y Kato III. Estos resultados demostraron que las proteínas HSBP47 y HSBP51 son las principales responsables de la adhesión de esta cepa a estas líneas celulares. Esta observación concuerda con lo previamente reportado por Vázquez-Juárez *et al.*, (2004) quien demostró que tratamientos con anticuerpos policlonales producidos contra una proteína de membrana de *Aeromonas veronii* disminuye de manera similar la adhesión de esta bacteria a líneas celulares HeLa S3. Trabajos *in vivo*, demostraron además que al inmunizar oralmente a ratones BALB/c con conjugados de proteínas que reconocen a sulfato de heparina de *H. pylori* 25 acoplados a la subunidad  $\beta$  de la toxina del cólera (HSBPs-CTB), se manifiesta una respuesta significativa de protección contra la infección experimental por *H. pylori* 25 (Ruiz-Bustos *et al.*, 2000). Esta protección se atribuyó principalmente a la capacidad que tienen estas proteínas de bloquear sitios de adhesión

específicos para HSBP's de *H. pylori* 25, previniendo así la colonización de esta cepa a células epiteliales gástricas.

Por otro lado, al realizar ensayos de desplazamiento de *H. pylori* 25, utilizando a las proteínas HSBP47 y HSBP51 y anticuerpos policlonales producidos contra estas, se observó que sólo la incubación de las células con las proteínas purificadas fue capaz de desplazar al menos en un bajo porcentaje, a *H. pylori* 25 de la superficie de células epiteliales HeLa S3 y Kato III. Este resultado sugiere que la adhesión de *H. pylori* a componentes de células epiteliales es específica y que además podría ser no reversible.

Se ha sugerido, que proteínas de *H. pylori* de bajo peso molecular pueden ser útiles para el diagnóstico, terapia y desarrollo de nuevas vacunas contra *H. pylori* (Volland *et al.*, 2002; Rathinavelu *et al.*, 2005). En este sentido, la segunda parte de esta tesis se enfocó en la caracterización molecular y clonación de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa HSBP47 y HSBP51.

A partir de la secuencia de péptidos internos de las proteínas HSBP47 y HSBP51, se diseñaron oligonucleótidos degenerados para la amplificación de secuencias internas de los genes que codifican para estas proteínas. Como resultado, se observaron dos productos amplificados de 700 pb y 950 pb para los genes *hsbp47* y *hsbp51*, respectivamente.

El análisis de similitud por BLAST entre estos fragmentos y secuencias depositadas en el Genbank, mostró un 96% de identidad entre el fragmento parcial del gen *hsbp47* y un factor de elongación (EF-Tu) de *Haemophilus influenzae* RD KW20 (NP\_438736.1). En este sentido, trabajos recientes demostraron que un factor de elongación de *Lactobacillus jhonsonii* La1 fue relacionado directamente con la capacidad de adhesión de esta cepa a células epiteliales Caco-2 y a mucinas (Granato *et al.*, 2004). Se ha demostrado en *L.*

*johnsonii* La1 y en *Mycoplasma pneumoniae* S<sub>1</sub> que este factor EF-Tu se encuentra ubicado en la superficie celular, además en *M. pneumoniae*, se le ha relacionado con el reconocimiento de ciertos componentes de la matriz extracelular de células epiteliales como fibronectina (Balasubramanian *et al.*, 2008; Dallo *et al.*, 2002). Al comparar el fragmento parcial del gen *hsbp47* con proteínas de *H. pylori*, se observaron porcentajes de identidad de 76% con la proteína NP\_223846.1 y de 40% con la proteína hipotética NP\_223150.1 de *H. pylori* J99. Curiosamente, este fragmento parcial mostró un porcentaje mayor de identidad con una proteína de una especie bacteriana diferente de *H. pylori*. Esta observación concuerda con lo previamente reportado por Huynen *et al.*, (1998), quien sugirió que el hecho de que *H. pylori* posea proteínas cuya función es la misma a la observada en otras especies patógenas, puede deberse a que comparten genes ortólogos, es decir, que parten de un gen ancestral que puede encontrarse en diversas especies.

Por otra parte, el fragmento parcial del gen *hsbp51* mostró 67% de identidad con una proteína hipotética de *Yersinia pseudotuberculosis* (IP\_32953) y de 40% con otra proteína hipotética de *H. pylori* J99 (AAD05984.1). La función biológica de dichas proteínas se desconoce, sin embargo ya que en el presente trabajo se demostró que HSBP51 juega un papel importante en la adhesión a células gastrointestinales, es de gran interés su caracterización.

Dado que este es el primer reporte en el que se le atribuye una función biológica como adhesinas a las proteínas HSBP47 y HSBP51, se continuó con la elucidación de la secuencia completa de los genes que codifican para las mismas.

Trabajos hechos en proteómica, han considerado al EF-Tu dentro de las diez principales proteínas antigénicas de *H. pylori* (Kimmel *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2006). Por esta razón se puede sugerir que la proteína HSBP47 es un candidato potencial para la producción de

vacunas contra *H. pylori*. Además ya que la proteína HSBP51 es una proteína de membrana externa, que juega un papel importante en el reconocimiento de *H. pylori* 25 a células epiteliales, esta proteína será utilizada de igual manera como antígeno para la inmunización contra *H. pylori*.

*S. cereviceae* ha sido utilizado con éxito para la expresión de antígenos recombinantes de *Escherichia coli* enterotoxigénica (Rezaee *et al.*, 2005) y de *Vibrio cholerae* (Arzanlou *et al.*, 2005) por mencionar algunos. En el presente trabajo, se utilizó a esta cepa como vector de expresión de los genes *hsbp47* y *hsbp51*, con el fin de utilizarla en ensayos *in vivo* en modelo de ratón.

La expresión de las proteínas recombinantes, se llevó a cabo mediante inducción con galactosa al 2%, en las clonas en las cuales fue confirmada la inserción de los fragmentos parciales de los genes *hsbp47* y *hsbp51*. La expresión de Aga2-HSBP47 recombinante fue observada en un gel desnaturalizante de poliacrilamida y confirmada mediante un western blot en el que se utilizó a anticuerpos policlonales anti- HSBP47. El tamaño de la proteína recombinante, varió ligeramente con respecto al de la proteína nativa (47 kDa). Esta diferencia se debe a la adición de 3 kDa dada por el péptido AGA2 en la proteína de fusión y que corresponde con lo previamente reportado (Schieck *et al.*, 2004).

La ubicación en la superficie de la proteína recombinante AGA2-HSBP47 fue confirmada mediante microscopía de fluorescencia. La expresión de la misma fue significativa a las 12 y 24 h en el 25 y 30% de las células de *S. cereviceae* observadas. En los tiempos posteriores la detección fue menor. Al utilizar la técnica de ELISA indirecta para la detección de AGA2-HSBP47, se observó mayor sensibilidad con este sistema en comparación con los anteriores, detectándose la mayor señal de reconocimiento en los tiempos 12 y 24 h en el

51-53% de las células de *S. cereviceae*. Las diferencias observadas entre ambas técnicas (microscopia y ELISA), en relación a los niveles de detección de las células que exponen en su superficie la proteína recombinante, puede deberse a la sensibilidad de cada una. Por una parte, la microscopia de fluorescencia es una técnica cualitativa en donde se utiliza un anticuerpo marcado con isocianato de fluoresceína (FITC), que al ser excitados con luz UV emite luz visible que se observa como fluorescente bajo el microscopio. Esta técnica está reportada como de menor especificidad en comparación con ELISA, debido a las variaciones en el período de excitación al exponer las preparaciones al microscopio, lo que la convierte en una técnica cualitativa más que cuantitativa (Tijssen, 1993). Por otro lado, la ELISA indirecta es una técnica más sensible y específica en la práctica, ya que permite una confirmación rápida y segura de detección de la proteína de fusión que permite la amplificación de la señal al unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario (Tijssen, 1993).

El porcentaje relativamente bajo de detección de células marcadas que expresan la proteína de fusión AGA2-HSBP47, puede atribuirse a que: **1)** la detección del conjugado AGA2-HSBP47 se llevó a cabo con anticuerpos policlonales, por lo que se recomienda utilizar anticuerpos monoclonales, de preferencia V5 o Xpress que reconocen péptidos codificados en el mismo vector, y **2)** el sistema de expresión pYD1 reporta tasas de expresión entre 50 - 70% (según el fabricante Invitrogen) aunque Lee *et al.* (2003) reporta tasas menores.

En los perfiles proteicos, western blot y experimentos de expresión (evaluados por microscopía de fluorescencia y ELISA indirecta) la proteína de fusión AGA2-HSBP51 no fue detectada. La baja o nula expresión de la HSBP51 puede deberse a una síntesis baja o a

un error de traducción; el problema más común es la diferencia en el uso de codones entre especies.

Nuestros resultados evidencian que es factible la expresión de péptidos sintéticos de *H. pylori* en la levadura *S. cerevisiae* con el empleo de vector inducible por galactosa. No obstante se pudieran probar otro tipo de vectores y condiciones para optimizar la expresión de péptidos.

Varios elementos fundamentan el uso de la levadura como sistema alternativo para la expresión de péptidos sintéticos con epítopes de *H. pylori*. Uno de ellos lo constituye el hecho de que varios autores recurren al uso de hospederos tales como bacterias atenuadas de *Salmonella typhimurium* (Li *et al.*, 2004), *Lactobacili* (Corthesy *et al.*, 2004), plantas transgénicas como la planta de tabaco (Gu *et al.*, 20005) o vacunas de ADN (Hatzifoti *et al.*, 2006) entre otros. Debido a las dificultades encontradas al tratar de expresar antígenos o su nulo efecto contra *H. pylori*, es preciso pensar en nuevas tecnologías o mejoramiento de las mismas formulaciones.



## 8. CONCLUSION

El hecho de avanzar en la identificación de proteínas de *H. pylori* 25 como HSBP47 y HSBP51 nos permitió elucidar el papel que juegan en la colonización inicial, además la obtención de éstos péptidos por la vía recombinante pueden tener aplicaciones en el desarrollo de futuros candidatos vacunales.

En el presente trabajo se identificaron a dos proteínas de membrana externa de *Helicobacter pylori* 25 (HSBP47 y HSBP51), las cuales participan en el proceso de adhesión a líneas celulares HeLa S3 y Kato III, demostrándose además que anticuerpos policlonales contra estas misma proteínas inhiben significativamente la adhesión de esta bacteria a líneas celulares HeLa S3 y Kato III. Además se obtuvo mediante inducción dirigida la expresión de la proteína recombinante AGA2-HSBP47 en la levadura *S. cerevisiae* EBY-100 detectada y analizada mediante las técnicas SDS-PAGE, Western blot, microscopia de fluorescencia y ELISA indirecta. La proteína recombinante HSBP47 conserva su característica de reconocer a sulfato de heparina, la cual es utilizada como estrategia en la prevención anti-adhesiva de la bacteria durante el proceso infeccioso.

Con la expresión de péptidos de *H. pylori* en *S. cerevisiae* es posible explorar el uso de la levadura como vector vivo no patogénico en vacunas orales en la prevención de infecciones por este patógeno. Además si se logra la expresión del péptido HSBP51 por vía recombinante permitirá desarrollar diferentes formulaciones basadas en vacunas de subunidades de naturaleza proteica, además de brindar la posibilidad de abordar diferentes estrategias de inmunización prime-boost heterólogas.

## 9. PERSPECTIVAS

1. Amplificación por PCR inversa y secuenciación de productos para obtención de la región completa de cada uno de los genes *hsbp47* y *hsbp51*.
2. Evaluar por la técnica de PCR semicuantitativo las muestras de ratón Balb/c obtenidas del ensayo experimental; estos ratones fueron inmunizado con levadura recombinante Sc/pYD1-*hsbp47* y posteriormente retados con *H. pylori*.
3. Subclonar e inducir la expresión del gen *hsbp51* en la levadura *S. cerevisiae* EBY-100..
4. Realizar ensayos de inducción continua para valorar su producción en la levadura de proteínas recombinantes.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alm, R. A., y Trust, T. J. 1999. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J Mol Med* 77, 834–846.
- Antoniukas, L., Grammel, H., Reichl, U. 2006. Production of hantavirus Puumala nucleocapsid protein in *Saccharomyces cerevisiae* for vaccine and diagnostics. *J Biotechnol* 124:347–362
- Arzanlou, M., Rezaee, A., Shahrokhi, N., Hossint, A. Z., Yasuda, Y., Tochikubo, K., Ahangarzadeh-rezaee, M. 2005. Expression of cholera toxin B subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals microbio.* 55(2): 145-150.
- Ascencio, F., Hansson, H.-A., Larm O., and Wadström T. 1995. *Helicobacter pylori* interacts with heparin and heparin-dependent growth factors. *FEMS Immunol. Microbiol. Med. Microbiol.* 12:265-272
- Ascencio, F.; Fransson, L. A. and Wadström, T. 1993. Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulfate. *J. Med. Microbiol.* 38: 240 – 244
- Balasubramanian, S., Kannan, T.R., Baseman, J.B. 2008. The Surface-Exposed Carboxyl Region of *Mycoplasma pneumoniae* Elongation Factor Tu Interacts with Fibronectin. *Infect. Immun.* 76: 3116-3123.
- Bazzoli, F., Berretti, D., De Luca, L., Nicolini, G., Pozzato, P., Fossi, S., Zagari, M. 1999. What can be learnt from the new data about antibiotic resistance? Are there any practical clinical consequences of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance? *European Journal of Gastroenterology and hepatology*; 11: S39-S42.
- Bidlingmaier, S., and Liu, B. 2006. Construction and application of a yeast surface-displayed human cDNA library to identify post-translational modification-dependent protein-protein interactions. *Mol. Cell. Proteomics.* 5: 533 –540.
- Blaser, M.J. 1992. Hypothesis on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology.* 102:720-7.
- Boder, E.T., Wittrup, K.D. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* 15:553–557.

- Bricknell, I.R., King, J.A., Browden, T.J., Ellis, A.E. 1999. Duration of protective antibodies, and the correlation with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following vaccination with an *Aeromonas salmonicida* vaccine containing ironregulated outer membrane proteins and secretory polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 139-151.
- Broach, J.R., J.R., Pringle, E. W. Jones. (Eds) 1991. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Vol. 1. Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y.
- Bult, C.J. *et al.*, 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058–1073
- Bumann, D., Aksu, S., Wendland, M., Janek, K., Zimny-Arndt, U., Sabarth, N., Meyer, T.F., Jungblut, P.R. 2002. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 70, 3396-403.
- Chmiela, M., Lanik, M., Czkwianiane, E., Rehcinski, T., Planeta-Malcka, I., Wadström, T. and Rudnicka, W. 1997. Attachment of *Helicobacter pylori* strains to human epithelial cells. *J. Phis. Pharmacol.* 48: 393 – 404.
- Chmiela, M., Paziak-Domanzka, B., Rudnika, W. and Wadström, T. 1995. The role of the heparan sulphate-binding activity of *Helicobacter pylori* bacteria in their adhesion to murine macrophages. *Act. Microbiol. Scand.* 103: 469 – 471.
- Corthesy, B., Boris, S., Isler, P., Grangette, C. and Mercenier, A. 2005. Oral iimmunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori* urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*. *J infect Dis.* 192: 1441-1449.
- Crabtree, J.E. 1996. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol*;31(Suppl 215):3-10
- Cregg, J.M., Lin Cereghino, J., Shi, J., and Higgins, D.R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16:23-52.
- Dallo, S.F., T.R., Kannan, M.W., Blaylock, and. Baseman, J.B. 2002. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 46:1041-1051.

- Daly, R., Hearn, T.W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* 18:119–138.
- Di Miceli, L., Pool, V., Kelso, J.M., *et al.* 2006. Vaccination of yeast sensitive individuals: review of safety data in the US vaccine adverse event reporting system (VAERS). *Vaccine*. 24:703-7.
- Dodsworth, S., Rowland, G., Bennett, A. y Coleman, G. 1993. Antigenicity of the *Aeromonas salmonicida* maltose-inducible outer membrane porin (maltoporin) and a hybrid protein derived from it. *Biochemical Society Transactions* 21: 338S.
- Donnini, C., Farina, F., Neglia, B., Compagno, MC., Uccelletti, D., Goffrini, P., Palleschi C. 2004. Improved Production of Heterologous Proteins by a Glucose Repression-Defective Mutant of *Kluyveromyces lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:5, 2632-2638.
- Dunn, B.E., Altmann, M. and Campbell, G. 1991. Adherence of *Helicobacter pylori* to gastric carcinoma cells: analysis by flow cytometry. *Rev. Infect. Dis.* 13 (supple.8) 557-564.
- Dunn, B.E., Cohen, H. and Blaser, M.J.. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:720-741.
- Eaton, K.A. and Krakowka, S. 1994. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 62: 3604–3607.
- Evans, D.G., Evans, Jr. D.J. and Graham, D.Y. 1989. Receptor-mediated adherence of *Campylobacter pylori* to mouse Y-1 adrenal cell monolayers. *Infect. Immun.* 57: 2272–2278.
- Evans, D.J., Evans, D.G., Engstrandt, L. and Graham, D.Y. 1992. Urease-associated heat shock protein of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 60: 2125–2127.
- Fang, H.M., Ling, K.C., Ge, R. and Sin, M. 2000. Enhancement of protective immunity in blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas), against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* by *A. hydrophila* major adhesin. *Journal of Fish Diseases* 23: 137-145.
- Fauchere, J.L. and Blaser, M. J. 1990. Adherence of *Helicobacter pylori* cells and their surface components to HeLa cell membranes. *Microb. Pathogen.* 9: 427-439.

- Ferrero, R. and Lee, A. 1991. The importance of urease in acid protection for the gastric-colonising bacteria *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis* sp. Nov. Microbiol. Ecol. Health. Dis. 4: 121–134
- Fleischmann, R.D., *et al.*, 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. Rd. Science 269, 496–512.
- Fraser, C.M. *et al.*, 1995. The *Mycoplasma genitalium* genome sequence reveals a minimal gene complement. Science 270, 397–403.
- Fujioka, T., Honda, S. and Tokieda, M. 2000. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma in animal models. J. Gastroenterology and Hepatology. 15: 55-59.
- Gellissen, G., Melber, K. 1996. Methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals. Arzneimittel-Forsch/Drug. Res.46:943-948.
- Ghiara, P., Marchetti, M., Blaser, M.J., Tummuru, M.K.R., Cover, T.L., Segal, E.D., Tompkins, L.S. and Rappuoli, R. 1995. Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in mouse model of disease. 63: 4154–4160.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., *et al.*, 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. Nature 418: 387–391.
- Giga-Hama, Y. 1997. Fission yeast *S. pombe*: an attractive host for heterologous protein production. In Foreign Gene Expression in Fission Yeast: *Schizosaccharomyces pombe*.. Springer Verlag; 3-28.
- Gilleland, H.E.Jr., Gilleland, L.B. and Matthews-Greer, J.M. 1988. Outer membrane protein F preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model. *Infection and Immunity* 56: 1017-1022.
- Gómez-Duarte, O., Yan, Z., and Lucas, B. 1997. Ureasa subunit A and strains protects mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori*. 41(Supl.1): A59-60.
- Goodwin, C.S. 1997. *Helicobacter pylori* gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer: Clinical and molecular aspects. Clin Infect Dis; 25(5):1017-1019.

- Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M., Corthésy-Theulaz I.E. 2004. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun.* 72(4):2160-2169.
- Gryboski, J.D. 1991. Peptic ulcer disease in children. *Med Clin North Am.* 75 (4):889-902.
- Gu, Q., Han, N., Liu, J., Zhu, M. 2005. Cloning of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene and its expression in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant cell Rep.* 24: 532-539.
- Guzmán-Murillo, M.A. 1997. Efecto de polisacáridos sulfatados de microalgas en adhesión de bacterias patógenas a líneas celulares humanas y de peces. Msc. Thesis. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California Sur México. 86p.
- Guzmán-Murillo, M.A. and Ascencio, F. 2000. Anti-adhesive activity sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. *Appl. Microbiol.* 30: 473–478.
- Guzmán-Murillo, M.A., Ruiz-Bustos, E. and Ascencio, F. 2001. Involvement of the heparan sulfated binding proteins of *Helicobacter pylori* in its adherence to HeLa S3 and Kato III cell lines. *J. Med. Microbiol.* 50: 320–329.
- Harlow, E. and Lane, D. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Harris, A. 1998. Current regimens for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *British Medical Bulletin:* 54: 195-205.
- Hatzifoti, C., Roussel, Y., Harris, A.G., Wren, B.W., Morrow, J.W., Bajaj-Elliott, M. 2006. Mucosal immunization with a urease B DNA vaccine induces innate and cellular immune responses against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 11:113-122.
- Hazell, S.L., Lee, A., Brady, L. and Hennessy, W. 1986. *Campylobacter pylori* and gastritis: association with intracellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J. Infect. Dis.* 153: 658–663.
- Herrera-Goepfert, R., Arista-Nasr, J., Alba-Campomanes, A. 1999. Pathologic features of the gastric mucosa adjacent to primary MALT-lymphomas. *J Clin Gastroenterol.* 29(3):266-269.

- Hirst, I.D., and Ellis, A.E. 1994. Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology* 4: 29-45.
- Ho, W.Y., Ho, K., Ascencio, F. and Ho. B. 2004. Neither gastric topological distribution nor principle virulence genes of *Helicobacter pylori* contributes to clinical outcomes. *World J. Gastroenterology*. 10: 3274-3277.
- Huynen, M.A. and Bork, P. 1998. The Frequency Distribution of Gene Family Sizes in Complete Genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5849–5856.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., *et al.*, 1998. *Helicobacter pylori* adhesion binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*.279:373-377.
- Jeanteur, D., Gletsu, N., Pattus, F. and Buckley, J.T. 1992. Purification of *Aeromonas hydrophila* major outer-membrane proteins: N-terminal sequence analysis and channel-forming properties. *Molecular Microbiology* 6: 3355-3363.
- Kimmel, B., Bosserhoff, A., Frank, R., Gross, R., Goebel, W., Beier, D. 2000. Identification of Immunodominant Antigens from *Helicobacter pylori* and Evaluation of Their Reactivities with Sera from Patients with Different Gastroduodenal Pathologies. *Infect Immun* 68: 915–920.
- Kulkarni, P.S., Raut, S.K., Patki, P.S., Phadke, M.A., Jadhav, S.S., Kapre, S.V., Dhorje, S.P., Godse, S.R. 2006. Immunogenicity of a new, low-cost recombinant hepatitis B vaccine derived from *Hansenula polymorpha* in adults. *Vaccine*. 24(17):3457-60.
- Lee, A., Fox, J.G. Otto, G. and Murphy, J. 1990. A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. *Gastroenterology*. 99: 1315 -1323.
- Lee, A., O'Rourke, J.L., Barrington, P.J. and Trust, T.J. 1986. Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*; a mouse fecal model. *Infect. Immun.* 51: 536-546.
- Lee, S.Y., Choi, J.H. and Xu, Z. 2003. Microbial cell surface display. *Trends Biotechnol.* 21:45-52.
- Lelwala-Guruge, J., Ljungh, A. and Wadström, T. 1992. Hemagglutination patterns of *Helicobacter pylori*: frequency of sialic acid-specific and non-sialic acid-specific haemagglutinins. *APMIS*: 100: 908–913.
- Lewin, B. 2001. *Genes VII*. Marbán libros, S.L. 990.



- Li, G.Q., Chen, M.H., Zhu, S.L., Chen, J., Jiao, Z.Y., Chen, W., Hu, P.J. 2004. Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* infection with attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* urease B subunit and catalase in mice. *Chinese Journal of Digestive Diseases*. 5(2): 72-75.
- Ljung, Å., Moran, A.P., Wadström, T. 1996. Interaction of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16, 117-126.
- Lutwyche, P., Exner, M.M., Hancock, R.E. and Trust, T.J. 1995. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout. *Infection and Immunity* 63: 3137-3142.
- Madzak, C., Otterbein, L., Chamkha, M., Moukha, S., Asther, M., Gaillardin, C., Beckerich, J.M. 2005. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 5 :635-646.
- Matsui, K. and Arai, T. 1990. Protective immunities induced by porins from mutant strains of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology and Immunology* 34:917-927.
- Michetti, P. 2004. Experimental *Helicobacter pylori* infection in humans: a multifaceted challenge. *Gut*. 53: 1220–1221.
- Mizote, T., Yoshiyama, H. and Nakazawa, T. 1997. Urease-independent chemotactic response of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate. *Infect. Immun.* 65: 1519-1521.
- Mobley, H., Mendz, G. and Hazell, S. 2001. *Helicobacter pylori* physiology and genetics. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 608.
- Moss, S.F., Blaser, M.J. 2005. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol*; 2: 90-97.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593-656.
- Nurminen, M., Butcher, S., Idanpaan-Heikkila, I., Wahlstrom, E., Muttillainen, S., Runeberg-Nyman, K., Sarvas, M. and Makela, P.H. 1992. The class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* produced in *Bacillus subtilis* can give rise to protective immunity. *Molecular Microbiology* 6: 2499-2506.

- O'toole, P.W., Janzon, L., Doig, P., Huang, I., Ostrzynska, M. and Trust, T.J. 1995. The putative neuraminyllactose-binding hemagglutinin HpA of *Helicobacter pylori* CCUG 17874 is a lipoprotein. *Infect. Immun.* 59: 6049–6057.
- Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G., Haas, R. 1999. Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol.* 31:1537-1548.
- Ofek, I., Doyle, R.J. 1994. Bacterial adhesion to cells and tissues. In: Ofek I, Doyle RJ, editors. New York: Chapman & Hall.
- Opazo, P., Muller, I., Rollán, A., Valenzuela, P., Yudelevich, A., Garcia-de la Guarda, R., Urra, S. and Venegas, A. 1999. Serological response to *Helicobacter pylori* recombinant antigens in Chilean infected patients with duodenal ulcer, non-ulcer dyspepsia and gastric cancer. *APMIS.* 107: 1069-1078.
- Park, J.W., Song, J.Y., Lee, S.G., Jun, J.S., Park, J.U., Chung, M.J., Ju, J.S., Nizamutdinov, D., Chang, M.W., Youn, H.S., Kang, H.L., Baik, S.C., Lee, W.K., Cho, M.J., Rhee, K.H. 2006. Quantitative analysis of representative proteome components and clustering of *Helicobacter pylori* clinical strains. *Helicobacter.* 11(6):533-543.
- Peek, R.M. Jr., Blaser, M.J. 2002. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer;* 2: 28-37.
- Psomas, E., Andrighetto, C., Tzanettaki, E.L., Lombardi, A., Tzanetakakis, N. 2002. Some probiotic properties of yeast isolates from infant faces and Feta Cheese. *Int. J. Food Microbiol.,* 69: 123-125.
- Rathinavelu, S., Kao, J.Y. Zavros, Y. and Merchant J.L. 2005. *Helicobacter pylori* outer membrane protein 18 (Hp1125) induces dendritic cell maturation and function. *Helicobacter.* 10(5):424-432.
- Rezaee, M.A., Rezaee, A., Moazzeni, S.M., Salmanian, A.H., Yasuda, Y., Tochikubo, K., Pirayeh, S.N. and Arzanlou, M. 2005. Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol.*43(4):354-360.
- Robinson, J., Goodwin, C.S., Cooper, M., Burke, V. and Mee, B.J. 1990. Soluble and cell-associated haemagglutinins of *Helicobacter (Campylobacter) pylori*. *J. Med. Microbiol.* 33: 277-284.

- Rodríguez, V.M., Montero, C., Machado, H., Joglar. 2002. The evaluation of yeast derivatives as adjuvants for the immune response to the Bm86 antigen in cattle. *BMC Biotechnol.*, 1:2.
- Rogan, D., Bibiuk, L.A. 2005. Novel vaccines from biotechnology . *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 24:1: 914-100.
- Ruíz-Bustos, E., Ochoa, J., Wadström, T. and Ascencio, F. 2001. Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate protoglycan. *J. Med. Microbiol.* 50: 215-222.
- Ruíz-Bustos, E., Sierra, A., Romero, M.J., Rodríguez-Jaramillo, C. and Ascencio, F. 2000. Protection of BALB/c mice against experimental *Helicobacter pylori* infection by oral immunization with *Helicobacter pylori* heparan sulfate-binding proteins coupled to cholera toxin  $\beta$ -subunit. *J. Med. Microbiol.* 49: 535 – 541.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2da Ed. USA.
- Schieck, E., Sanchez, C.P., Lanzer, M. 2004. Targeting a DBL3c domain of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 to the surface of *Saccharomyces cerevisiae*. *Parasitol Res.* 93: 318–321.
- Schreuder, M.P., Deen, C., Boersma, W.J.A., Pouwels, P.H and Klis F.M. 1996. Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. *Vaccine.* 14, 383-388.
- Scott-Algood, H.M., Cover, T.L. 2006. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clin. Microbiol. reviews.* 19(4):597-613.
- Stubbs, A.C., Wilson, C.C. 2002 Recombinant yeast as a vaccine vector for the induction of cytotoxic T-lymphocyte responses. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 4:35-40.
- Suerbaum, S., Josenhans, C. and Labigne, A. 1993. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin gene and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.* 175: 3278–3288

- Tabaraie, B., Sharma, B.K., Sharma, P.R., Sehgal, R. y Ganguly, N.K. 1994. Evaluation of *Salmonella* porins as a broad spectrum vaccine candidate. *Microbiology and Immunology* 38: 553-559.
- Terentiev, Y., Breuer, U., Babel, W. Kunze, G. 2004. Non-conventional yeasts as producers of polyhydroxyalkanoates genetic engineering of *Arxula adenivorans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64: 376–381.
- Thieblemont, C., Berger, F., Coiffier, B. 1995. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Curr Opin Oncol.* 7(5):415-420.
- Thomas, J. *et al.*, 2005. Screening of Molecular Repertoires by Microbial Surface Display, *Comb Chem High Throughput Screen.* 8(2):127-33.
- Tijssen, P. 1993. Purification of immunoglobulins and preparation of Fab fragments. *Practice and theory of enzyme immunoassays.* Amsterdam, Netherland: Elsevier Science Publishers BV. 15: 95-101.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A. R. & 39 other authors.1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388, 539–547
- Trust, T.J., Doig, P., Emody, L., Kienle, Z., Waström, T. and O' Toole, P. 1991. High-affinity binding of the basement membrane proteins collagen type IV and laminin to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*59: 4398-4404.
- Utt, M. and Wadström, T. 1997. Identification of heparan sulphate binding surface proteins of *Helicobacter pylori*: inhibition of heparan sulphate binding with sulphate carbohydrate polymers. *J. Med. Microbiol.* 46: 541–546.
- Vázquez-Juárez, R.C., Romero-Geraldo, M.J. and Ascencio, F. 2004. Adhesive properties of a LamB-like outer membrane protein and its contribution to *Aeromonas veronii* adhesion. *Journal of Applied Microbiology.* 96(4):700-708.
- Versalovic, J., Osato, M.S., Spakovsky, K., Dore, M.P., Reddy, R., Stone, G.G., Shortridge, D., Flamm, R.K., Tanaka, S.K., Graham, D.Y. 1997. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 40(2):283–286.
- Voland, P., Weeks, D.L., Vaira, D., Prinz, C. and Sachs, G. 2002. Specific identification of three low molecular weight membrane-associated antigens of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol. Ther.* 16: 533–544.

- Wadström, T., Hirno, S., Novak, H., Guzmán, A., Ringnér-Pantzar, M., Utt, M., Aleljung, P. 1997. Sulfatides inhibit binding of *Helicobacter pylori* to the gastric cancer Kato III cell line. *Current microbiology*. 34(5):267-72.
- Wadström, T.; Ascencio, F.; Ljungh, A; Lelwala-Guruge, J.; Rignér, M.; Utt, M. and Valkonen, K. 1993. *Helicobacter pylori* adhesions. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol*. 5: Suppl 2: 12–15.
- Wang, W.M., Chen, C.Y., Jan, C.M., Chen, L.T., Perng, D.S., Lin, S.R., *et al.*, 1994. Long-term follow-up and serological study after triple therapy of *Helicobacter pylori*-associated duodenal ulcer. *Am J Gastroenterol*; 89: 1793-1796.
- Wizemann, T.; Adamaou, J. and Lagermann S. 1999. Adhesin as targets for vaccine development. *Emerg. Infect. Dis.* 5(3): 395-403.
- Yoenhee, L., Shin, E., Lee, J. and Park, J. 1999. *Lactobacillus acidophilus* inhibits the *Helicobacter pylori* adherence. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 794-797.
- Zhang, A.M., Moo-Young, and Chisti, Y. 1996. Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces*. *Biotechnol. Adv.* 14, 401-435.