

UCH-FC
Biotecnología
V161
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



**“Función del regulador transcripcional Fur en la resistencia al ácido de
Helicobacter pylori”**

Memoria de título entregada a la Universidad de Chile como requisito parcial para optar al
título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Manuel Alejandro Valenzuela Valderrama



Director de Tesis

Dr. Héctor Toledo Araya

Santiago, 2003



**FUNCIÓN DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL FUR EN LA RESISTENCIA AL
ÁCIDO de *Helicobacter pylori*”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

MANUEL ALEJANDRO VALENZUELA VALDERRAMA

Director de Memoria de Título
Dr. Héctor Toledo Araya

Handwritten signature of Héctor Toledo Araya in black ink, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Carlos Jerez Guevara
Presidente Comisión

Handwritten signature of Carlos Jerez Guevara in black ink, written over a horizontal line.

Dra. Rosalba Lagos Mónaco

Handwritten signature of Rosalba Lagos Mónaco in black ink, written over a horizontal line.

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Handwritten signature of Víctor Cifuentes Guzmán in black ink, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, _____ 2003

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quiero agradecer a Dios por darme las capacidades necesarias para poder llegar hasta el final de esta historia y por rodearme de un grupo de personas que ha llegado a ser una referencia importante en mi vida. Dentro de este grupo, doy las gracias al Dr. Héctor Toledo por haber confiado en mi trabajo, soportar mi inexperiencia y su buena disposición durante los momentos malos.

Agradezco a todos mis amigos que compartieron mi diario vivir en el laboratorio durante la realización de esta tesis: Jeannette, Oscar, Luis, Angélica.

Agradezco a mi Padre por apoyarme durante todos estos años

A mi Madre por ser el sostén espiritual en las horas de angustia

A mis hermanos Osvaldo y Catherine, porque a pesar de la distancia estuvieron siempre presentes

A Magaly y mis hermanos menores, Emmanuel y Karen, por todos estos años compartidos.

Debo agradecer en forma especial al Dr. Carlos Jerez por la ayuda prestada para la realización de esta memoria de título.

... y a todas aquellas personas con las cuales compartí, reí o ayudaron en mi trabajo durante este periodo

Esta Memoria de Título fue realizada en el Laboratorio de Microbiología Molecular, programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue financiada parcialmente por el Proyecto ENL-2001/03

ÍNDICE

INDICE	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Mecanismo de respuesta al estrés de pH ácido en <i>Salmonella entérica serovar typhimurium</i>	4
1.2 Respuesta al estrés ácido en <i>Escherichia coli</i>	7
1.3 Regulación de la homeostasis de pH y respuesta a condiciones de acidez en <i>Helicobacter pylori</i>	8
1.4 Ácidos orgánicos y la respuesta de tolerancia al ácido	14
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
3. MATERIALES	18
3.1 Cepas bacterianas utilizadas	18
3.2 Medios de cultivo	18
3.3 Antibióticos	19
3.4 Reactivos	19
3.5 Plasmidios	20
3.6 Partidores	20
4. MÉTODOS	21
4.1 Almacenamiento y cultivo de las cepas bacterianas	21
4.2 Crecimiento de <i>H. pylori</i> en medio de cultivo líquido	21
4.3 Preparación de DNA cromosómico de <i>H. pylori</i>	22
4.4 Preparación de DNA plasmidial	23
4.5 Amplificación del gen <i>fur</i> de <i>H. pylori</i> mediante la técnica de PCR	23
4.6 Digestión de DNA con endonucleasas de restricción	23
4.7 Electroforesis en geles de agarosa	24
4.8 Determinación de la concentración de DNA	24
4.9 Purificación de DNA desde geles de agarosa	24
4.10 Purificación de DNA a partir de reacciones de PCR	25
4.11 Tratamiento del DNA con la Polimerasa del fago T4	25
4.12 Fosforilación de insertos	25
4.13 Desfosforilación de vectores plasmidiales	26
4.14 Ligación de fragmentos de DNA	26

4.15 Preparación de células electrocompetentes	27
4.16 Transformación bacteriana con DNA plasmidial	27
4.16 Transformación natural de <i>H. pylori</i>	27
4.16 Electrotransformación de <i>E. coli</i> DH5 α	27
4.17 Preparación de la muestra para electroforesis bidimensional	28
4.18 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida	28
4.18 Primera dimensión	28
4.18 Segunda dimensión	29
4.19 Análisis cuantitativo de expresión de proteínas	30
4.20 Ensayos de adaptación y tolerancia al ácido	30
4.21 Determinación de las células viables	30
4.22 Análisis estadístico	31
5. RESULTADOS	32
5.1 Análisis bioinformático del gen <i>fur</i> de <i>H. pylori</i>	32
5.2 Construcción de una cepa mutante <i>fur</i> negativa de <i>H. pylori</i>	36
5.3 Inducción de la respuesta de tolerancia al ácido en <i>H. pylori</i>	38
5.4 Crecimiento de <i>H. pylori</i> 43504 y de su mutante isogénica FUR504 en medio de cultivo líquido	39
5.5 Respuesta de tolerancia al ácido en <i>H. pylori</i> FUR504	41
5.6 Síntesis de proteínas durante la adaptación a pH 6,0	42
5.7 Análisis del patrón de proteínas expresadas durante la adaptación de <i>H. pylori</i> 43504 a pH 6,0	43
5.8 Patrón electroforético de las proteínas de <i>H. pylori</i> 43504 y FUR504 mediante electroforesis bidimensional	45
5.9 Análisis del patrón electroforético de la cepa FUR504 de <i>H. pylori</i> durante la adaptación a pH 6,0	46
5.10 Adaptación a ácidos orgánicos y respuesta ATR	48
5.11 Efecto de los ácidos orgánicos sobre la síntesis de proteínas en <i>H. pylori</i>	51
5.12 Análisis de la expresión de proteínas en <i>H. pylori</i> después del tratamiento de las bacterias con ácidos orgánicos.	53
6. DISCUSIÓN	55
6.1 Respuesta de tolerancia al ácido en <i>H. pylori</i>	55
6.2 Función del regulador transcripcional Fur en el desarrollo de la respuesta ATR en <i>Helicobacter pylori</i>	58
6.3 Respuesta de adaptación de <i>H. pylori</i> a la presencia de ácidos orgánicos	62
7. CONCLUSIONES	64
8. BIBLIOGRAFÍA	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Secuencia aminoacídica de Fur	34
Figura 2.	Estrategia general de clonamiento	37
Figura 3.	Análisis mediante PCR del gen <i>fur</i> mutagenizado	38
Figura 4.	Respuesta de tolerancia al ácido en <i>H. pylori</i>	39
Figura 5.	Crecimiento de <i>H. pylori</i> en medio líquido	40
Figura 6.	Respuesta de tolerancia al ácido de las cepas <i>H. pylori</i> 43504 y FUR504	42
Figura 7.	Análisis de la expresión de proteínas durante la respuesta ATR en <i>H. pylori</i> mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida del tipo NEPHGE	44
Figura 8.	Análisis 2D-PAGE del patrón de proteínas durante la adaptación a pH 7,2 de <i>H. pylori</i> 43504 y FUR504	46
Figura 9.	Patrón electroforético de las proteínas expresadas durante la adaptación a pH 6,0 en las cepas <i>H. pylori</i> 43504 y FUR504	47
Figura 10.	Respuesta de tolerancia al ácido de <i>H. pylori</i> 43504 y FUR504 inducida por ácidos orgánicos	50
Figura 11.	Patrón electroforético de las proteínas de <i>H. pylori</i> tratada con ácidos orgánicos	52.
Figura 12.	Análisis bidimensional de las proteínas de <i>H. pylori</i> 43504 después del tratamiento con ácido propiónico	54
Figura 13.	Representación esquemática de las proteínas reguladas por ácido en <i>H. pylori</i>	62

ABREVIATURAS

Amp	: Ampicilina.
AMPc	: Adenosina monofosfato cíclica.
ATCC	: American type culture collection.
ATP	: Adenosina trifosfato.
ATPasa	: Adenosina trifosfatasa.
ATR	: Respuesta de tolerancia al ácido.
BSA	: Seroalbúmina de bovino.
C	: Capacitancia.
Cam	: Cloramfenicol.
Ci	: Curie.
CIAP	: Fosfatasa alcalina de intestino de ternera.
CDNA	: DNA complementario
CTAB	: Bromuro de cetiltrimetilamonio.
Da	: Dalton.
dNTP	: Desoxinucleósido trifosfato.
DNA	: Ácido desoxirribonucleico.
DO ₅₆₀	: Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nanómetros.
EDTA	: Ácido etilendiaminotetracético.
F	: Faradio.
FPM	: Fuerza protón-motriz.
g	: gramo.
h	: Hora
IPTG	: Isopropil-β-D-tiogalactósido.
Kan	: Kanamicina.
kb	: Kilobase.
kDa	: Kilodalton.
kV	: Kilovolt.
l	: Litro
LPS	: Lipopolisacárido.
mA	: Miliamper.
mM	: Milimolar.
min	: minuto.
ml	: Mililitro.
mRNA	: RNA mensajero.
nm	: Nanómetro.
NEPHGE	: Electroforesis en un gradiente de pH al no equilibrio.
Ω	: Ohm.
ORF	: Marco de lectura abierto.
PAGE-SDS	: Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.
pb	: Pares de bases.
PBS	: Amortiguador fosfato-salino.
PEG	: Polietilenglicol.

PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa.
PM	: Peso molecular.
RNA	: Ácido ribonucleico.
RNasa	: Ribonucleasa.
rpm	: Revoluciones por minuto.
seg	: Segundo.
SDS	: Dodecilsulfato de sodio.
TAE	: Tris EDTA acético.
Taq pol	: DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i> .
TEMED	: N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina.
Tm	: Temperatura de melting
Tris-HCl	: Clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano.
TSA	: Agar soya triptona.
U	: Unidad enzimática.
μCi	: Microcurie.
μF	: Microfaradio.
ufc	: Unidades formadoras de colonias.
μl	: Microlitro.
V	: Volt.
x-gal	: Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido.

RESUMEN

Desde que la respuesta de tolerancia al ácido (ATR) se identificó en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, este mecanismo de adaptación se ha encontrado en una gran cantidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas. El objetivo principal de este estudio fue analizar la respuesta ATR en la bacteria gástrica *Helicobacter pylori*. Este es un organismo neutrófilo, Gram negativo, microaerofílico, ureolítico, cuyo único nicho conocido es la mucosa gástrica humana. La respuesta ATR se ha definido como un mecanismo que se desarrolla modificando la expresión de un grupo de genes que tienen que ver con la homeostasis de pH y la adaptación de las bacterias al estrés de pH ácido. En *Salmonella typhimurium* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bidimensionales se identificaron 49 proteínas que modifican su expresión frente al estrés de pH ácido y esta respuesta está regulada por diversos reguladores transcripcionales, entre los cuales se encuentra el regulador transcripcional Fur, que originalmente fue caracterizado como un regulador de la homeostasis de hierro. En *H. pylori* la adaptación al pH ácido del estómago se piensa que depende en gran medida de la presencia de la ureasa. Nuestros estudios de adaptación al pH ácido en *H. pylori* 43504 muestran que la bacteria es capaz de desarrollar una respuesta ATR independiente de ureasa cuando el microorganismo se expone a ácidos inorgánicos como orgánicos de cadena corta. Esta respuesta es tiempo-dependiente y necesita de la síntesis de proteínas. El análisis del proteoma de *H. pylori*, mediante electroforesis bidimensional, durante la respuesta ATR, permitió detectar 51 proteínas que modifican su expresión como respuesta al estrés de pH. Por otra parte, mediante el uso de un mutante isogénico *fur* de la cepa de *H. pylori* 43504 determinamos que la respuesta ATR está bajo el control del regulador transcripcional Fur y que la mutación desarrolla un fenotipo sensible al ácido. El análisis del proteoma de la cepa mutante expuesta a pH ácido permitió identificar un grupo de proteínas que podrían dar cuenta del fenotipo sensible al ácido.

ABSTRACT

Since the acid tolerance response (ATR) was identified in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* this mechanism was found in many Gram negative and Gram positive bacteria. The main scope of this work was to study the ATR response in the gastric bacterium *Helicobacter pylori*. This is a neutrophilic, Gram negative, microaerophilic, and ureolytic organism that colonize the human stomach. The ATR response is an inducible acid protection system that modified the expression of a group of genes involves with the pH homeostasis and the acid stress adaptation mechanism. In *S. typhimurium*, by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis, 49 proteins modified their expression and that mechanism is regulated by several transcriptional regulators, one of them it is the Fur transcriptional regulator, originally characterized as iron homeostatic regulator. The main acid mechanism adaptation in *H. pylori* is the urease. Our acid pH adaptation studies in *H. pylori* 43504 show that the bacteria is able to develop an urease independent ATR response when the microorganism is expose either inorganic or short-chain organic acids. This response is time dependent and the protein synthesis is required. The *H. pylori* proteome analysis by two-dimensional electrophoresis, during ATR response, showed modification of the expression in 51 proteins, and the study with the *fur* isogenic mutant of *H. pylori* 43504 strain showed that the ATR response is under Fur control and the mutation causes an acid-sensitive phenotype. The *fur* mutant strain protein analysis showed a group of proteins that modified their expression when the bacteria is exposed to acid and they could be involve in the acid-sensitive phenotype.

1. INTRODUCCIÓN

La capacidad para sentir y responder a cambios en el ambiente, es una característica esencial para la supervivencia de cualquier microorganismo. En la infección microbiana, durante la invasión de los tejidos y la proliferación en el sitio de colonización, los microorganismos se enfrentan a cambios radicales, comparados con los encontrados antes de la infección (aire, agua, alimentos, condiciones de laboratorio, etc.). Además, los microorganismos deben enfrentar y evadir al sistema inmune. Estas situaciones, deben ser superadas con estrategias que le permitan sobrevivir en el hospedero invadido y finalmente colonizarlo (Mekalanos y col., 1992).

En bacterias, la expresión genética puede ser modificada en respuesta a las condiciones ambientales a las que se enfrentan. Algunas de las señales, generadas en el medio aportado por el hospedero, capaces de inducir una respuesta a nivel de la expresión genética son, la escasa disponibilidad de hierro u otros iones, la temperatura alta, los cambios de osmolaridad y de pH, la disminución de la tensión de oxígeno y/o CO₂ (Mekalanos y col., 1992). Dependiendo de la severidad y duración del estrés, se observa que tanto el crecimiento como la supervivencia de los microorganismos son inhibidos.

Los cambios en la expresión de los genes como respuesta a las variaciones del medio ambiente pueden estudiarse bajo condiciones definidas, tales como: carencia de nutrientes y/o hierro, modificando la tensión de oxígeno, la osmolaridad del medio, el pH o la temperatura. Todas estas condiciones pseudo-fisiológicas y variables físico-químicas están asociadas a la expresión de factores de virulencia en los microorganismos patógenos (Mekalanos y col., 1992). Un estudio realizado en *Escherichia coli*, mediante la hibridación

de cDNAs derivados del mRNA total, a un "DNA microarray" del genoma completo, evaluó los cambios globales en la expresión genética frente a la modificación de los nutrientes en el medio de cultivo y confirmó que *E. coli* expresa diferentes genes cuando se crece en un medio rico comparado con un medio mínimo (Tao y col., 1999). Estos resultados confirman en un solo experimento, los estudios genéticos clásicos y de biología molecular, en genes particulares realizados en los últimos 50 años, que mostraron determinadas variaciones de la expresión genética como respuesta a las condiciones nutricionales a las que se enfrenta la bacteria.

Los mecanismos de adaptación desarrollados por las bacterias como respuesta a los cambios de temperatura, sales, agentes que dañan el DNA y el estrés oxidativo son ampliamente conocidos y se han estudiado en detalle (Little, 1993; Yura y col., 1993; Farr y Kogoma, 1991; Bukau, 1993). Sin embargo, se conoce mucho menos respecto de los mecanismos desarrollados por las bacterias como respuesta a los pH extremos.

La capacidad de adaptación desarrollada por las bacterias patógenas para tolerar ambientes agresivos, tanto dentro del hospedero como fuera de éste, juega un papel importante en determinar el éxito de ellas como patógenos. Cuando la ruta de infección es la vía oral, el pH ácido de las secreciones gástricas actúa como una barrera que impide la invasión por la bacteria (Drasar, y col., 1969; Giannella, y col., 1973). Sin embargo, el pH ácido también aumenta la virulencia de algunas bacterias patógenas modificando la expresión de genes específicos (Olson, 1993).

Al pasar al intestino el pH es cercano a la neutralidad, sin embargo, hay una alta concentración de ácidos orgánicos de cadena corta (AOCC), producidos por las reacciones de fermentación de la microflora intestinal, los que resultan agresivos para las bacterias debido a que las formas protonadas de dichos ácidos pueden difundir a través de la membrana citoplasmática, disociarse y bajar el pH interno de la bacteria, aún cuando el pH externo sea neutro. A pH externo bajo, la concentración de protones es alta por lo tanto los ácidos estarían no disociados o protonados aumentando la cantidad de ácido disponible para atravesar la membrana (Foster y col., 2000).

La respuesta al estrés de pH en algunos microorganismos incluye componentes de resistencia tanto inducibles como constitutivos. Los mecanismos de resistencia al estrés de pH constitutivos, o intrínsecos, incluyen los sistemas "housekeeping" de mantención de la homeostasis de pH, cuyas actividades (más que la síntesis) varían con el pH. También contribuyen a la tolerancia intrínseca en ácido o base factores como las estructuras de las membranas que influyen en la permeabilidad de protones, la capacidad amortiguadora interna, y la estabilidad frente a variaciones del pH de proteínas esenciales. Los mecanismos inducibles de tolerancia al estrés de pH están más débilmente definidos. Potencialmente, ellos pueden incluir sistemas inducibles que alteran el bombeo de protones, disminuyen la permeabilidad de la membrana, modifican la producción de chaperonas, reparan el DNA o previenen el daño de macromoléculas. (Foster y col., 1995)

Salmonella typhimurium y *E. coli* crecen en medio mínimo en condiciones de acidez entre pH 5 y pH 8,5, lo que representa un rango de variación de la concentración de protones de 3000 veces. Estos organismos pueden sobrevivir desde pH 4 a pH 9 durante extensos periodos de tiempo. Sin embargo, si las células son adaptadas primero a

condiciones moderadamente ácidas o alcalinas antes de determinar sus pHs límite, se puede encontrar que ellas sobreviven en un rango de variación de la concentración de protones sobre 1.000.000 de veces. Esta capacidad es muy importante para ambos microorganismos tanto en situaciones normales como de patogénesis donde las condiciones de pH fluctúan dramáticamente (Renberg y col.,1993).

Los factores de virulencia en las enterobacterias están regulados coordinadamente por una variedad de señales ambientales ya mencionadas (Miller y col.,1989). Un número creciente de factores de virulencia inducibles por ácido están siendo identificados en *E. coli*, *S. typhimurium*, y otras enterobacterias (Slonczewski y col.,1996).

1.1 Mecanismo de respuesta al estrés de pH ácido en *Salmonella entérica serovar typhimurium*.

Durante su ciclo de vida, *S. typhimurium* puede sobrevivir en diferentes ambientes en los cuales el pH es ácido: aguas estancadas, los fluidos ácidos del estómago y los del colon. Sin embargo, la exposición más relevante al ácido ocurre después de la invasión del epitelio intestinal donde la bacteria ya fagocitada por macrófagos prolifera en los fagosomas, organelos que poseen un pH entre 5 y 6. Al continuar con su ciclo infectivo, *S. typhimurium* aun dentro de los macrófagos tiene la capacidad de sobrevivir al pH 3 a 4 que poseen los fagolisosomas (Fields, 1980). Esta capacidad de sobrevivir en condiciones extremas de acidez, en el macrófago, se explica porque la bacteria responde al estímulo agresor expresando su mecanismo de respuesta de tolerancia al ácido (ATR) que le permite sobrevivir a pesar de que este pH es normalmente bactericida para esta bacteria, en ensayos

in vitro (Foster y Hall, 1990). Por otra parte, esta respuesta a la acidez es un importante factor de virulencia (Garcia-del Portillo y col. 1993). La respuesta ATR ocurre porque la exposición de los microorganismos a un medio moderadamente ácido gatilla la síntesis de proteínas que protegen a la bacteria frente a condiciones más extremas de acidez (Foster y Hall, 1991).

El ATR es una respuesta global frente a cambios de pH, lo que implica la expresión de varios genes cuya función es mantener la homeostasis de pH interno de la célula bacteriana en niveles compatibles con la vida. Para que este mecanismo se induzca, las células crecidas logarítmicamente a pH 7,6 deben ser expuestas a un pH moderadamente ácido, entre 5,5 y 6, durante un cierto tiempo para adaptarlas al pH ácido. Estas células así tratadas presentan entre 100 a 1.000 veces más resistencia a un subsecuente cambio a un pH extremo (pH 3,3) comparadas con las células no adaptadas que son transferidas directamente de pH 7,6 a 3,3. Esta respuesta de tolerancia a la acidez requiere de la síntesis de proteínas y resulta ser un mecanismo de defensa específico frente al ácido. El análisis mediante electroforesis bidimensional de las proteínas inducidas por el ácido revela 18 proteínas con modificación en su expresión, 6 de las cuales se reprimen mientras que otras 12 se inducen por el cambio al pH ácido moderado. Esta inducción de los genes ATR protege al microorganismo de condiciones más extremas de acidez como las que *S. typhimurium* encuentra en el fagolisosoma de los macrófagos (Foster y Hall, 1990). Este sistema de homeostasis de pH opera cuando el pH externo es inferior a 4 y su función es la de mantener el pH interno entre 5 y 5,5 (Foster y Hall, 1991).

En la fase logarítmica de crecimiento de *S. typhimurium*, varios genes regulatorios participan en la inducción del mecanismo ATR. Entre ellos *rpoS*, que codifica para el factor σ^S de la RNA polimerasa, el regulador de hierro Fur y el sistema de transducción de señales PhoPQ. Cada uno de estos reguladores controla un subgrupo de proteínas de estrés ácido (ASPs). El mecanismo ATR dependiente del factor σ^S es necesario para la respuesta de la célula cuando ésta se enfrenta a AOCC y también contribuye a la tolerancia frente a ácidos inorgánicos. Esta misma función regulatoria que presenta el factor σ^S se ha descrito en otros organismos como *Bacillus subtilis* y *Listeria monocytogenes* (Gaidenko y Price, 1998; Weimann y col., 1998). Por otra parte, el regulador de hierro Fur, normalmente actúa como un co-represor unido a hierro. Sin embargo, durante su participación en el mecanismo de adaptación a pH ácido regula la expresión de un grupo de proteínas de estrés ácido (ASPs) en forma independiente de hierro.

Durante la fase estacionaria del crecimiento, *S. typhimurium* desarrolla un mecanismo ATR independiente del factor σ^S y parece ser diferente al observado en la fase logarítmica de crecimiento (Foster, 1999). En esta etapa del crecimiento, el único regulador involucrado en la respuesta ATR es OmpR. Este regulador normalmente responde a los cambios de osmolaridad cuando es fosforilado por el sensor de transmembrana EnvZ, modificando la expresión de *ompC* y *ompF*, dos genes que codifican para porinas. Sin embargo, su función como regulador del mecanismo ATR es independiente de EnvZ (Foster y col., 1999).

1.2 Respuesta al estrés ácido en *E. coli*.

E. coli, al igual que *S. typhimurium*, posee un mecanismo de respuesta ATR en la fase logarítmica como en la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, existen diferencias en el mecanismo de respuesta entre estas dos bacterias. Una de las diferencias más notables es que *E. coli*, al igual que *L. monocytogenes* (Phan-Thanh y Montagne, 1998), presenta una mayor capacidad para sobrevivir a pH 2 (Lin y col., 1995). *S. typhimurium* sobrevive escasamente a pH inferior a 3,0, mientras que *E. coli* puede sobrevivir varias horas a pH 2,0. Esta diferencia se observa solo en medios ricos ya que ambos microorganismos presentan una sobrevivencia similar cuando se estudia el efecto de pH en medio mínimo (Foster y col., 1999). La mayor capacidad de resistir al ácido que presenta *E. coli*, se debe a la presencia de tres sistemas que se expresan durante la fase estacionaria de crecimiento. El primer sistema de resistencia al ácido incluye al factor σ^S y un sistema dependiente de una proteína receptora de AMPc que protege a las células a pH 2,0 en medio mínimo; el segundo, requiere de glutamato y de un intercambiador de glutamato/ácido γ -amino butírico (GadC) y el tercero, es dependiente de arginina, el cual requiere de la enzima arginino descarboxilasa, codificada por el gen *adiA*. De estos sistemas, el más relevante es el dependiente de glutamato, el cual en presencia del intercambiador GadC, permite la tolerancia a pH 2,5.

E. coli también, posee un mecanismo de respuesta ATR que se expresa en la fase logarítmica de crecimiento, el cual se conoce como "habitación al cambio de pH". Aunque, presenta un sistema de iguales características al de *S. typhimurium* en medio mínimo, en estas condiciones la respuesta ATR en *E. coli* está fuertemente modulado por fosfato (Bearson y col., 1997).

Por otra parte, algunos estudios sugieren que el mecanismo de respuesta ATR que opera en la fase logarítmica de crecimiento es diferente entre ambos microorganismos. Por ejemplo, en la fase logarítmica en medio mínimo, la respuesta ATR de *S. typhimurium* es dependiente del factor σ^S y Fur, mientras que el de *E. coli* es dependiente de CysB (Rowbury y Googson, 1997), el regulador transcripcional de los genes involucrados en la biosíntesis de la cisteína en bacterias Gram-negativas.

1.3 Regulación de la homeostasis de pH y respuesta a condiciones de acidez en *H. pylori*

H. pylori es una bacteria neutrófila, Gram negativa, ureolítica, mótil, única en su capacidad de colonizar el estómago humano. Es microaerofílica, bacillar, de 3 a 5 μm de longitud y 0.5 μm de diámetro, con seis flagelos unipolares, (Dunn y col., 1997). Su genoma ha sido secuenciado recientemente y posee alrededor de 1500 marcos de lectura, que codifican para una diversidad de proteínas. Alrededor de un tercio de los genes permanecen sin asignación de función mientras que los dos tercios restantes se conocen por homología a otras proteínas identificadas en otras bacterias (Tomb y col., 1997). La forma espiral de este bacilo junto con su manojito unipolar de flagelos le ha permitido adaptarse para penetrar y nadar rápidamente en la viscosa capa mucosa que protege al epitelio gástrico (Warren y Marshall, 1983; Hazel y col., 1986; Jung y col., 1997; Nakamura y col., 1998). Esta bacteria es el agente causante de la gastritis crónica en humanos y su presencia incrementa el riesgo de desarrollar úlcera péptica y adenocarcinoma en el estómago (Cover y Blaser, 1996).

Las condiciones del nicho ecológico de *H. pylori* son dominadas por las ATPasas de H^+ y K^+ gástricas, las cuales secretan ácido hacia el lumen del estómago. Luego de la colonización la bacteria debe tolerar las variaciones de pH que se producen en la capa mucosa, donde el gradiente de pH va desde 2 en el lumen a aproximadamente 7 en la superficie del epitelio (Quigley y Turnberg, 1987). En estas condiciones, la bacteria ha desarrollado estrategias fisiológicas para sobrevivir. *In vitro*, *H. pylori* puede crecer entre pH 4,5 y 8, siendo su rango óptimo entre 6 y 7. En ausencia de urea, la bacteria no puede sobrevivir a pH inferiores al rango entre 4,5 y 5 (Toledo y col. 2002; Marshall y col., 1990; Clyne y col., 1995). En cambio en presencia de urea, la bacteria puede sobrevivir *in vitro* a pHs tan bajos como 1 (Resultados no publicados).

La forma helicoidal característica de *H. pylori* y los flagelos facilitan su movilidad en la capa mucosa a pesar de su viscosidad, permitiéndole escapar del pH extremadamente bajo del lumen gástrico. Su capacidad quimiotáctica a urea y bicarbonato (Mizote y col., 1997) le permite a la bacteria alejarse de la superficie mucosa y dirigirse a los centros de mayor concentración de estos agentes químicos requeridos para amortiguar los cambios de pH. Aunque, el mucus es una barrera parcial al contenido ácido del lumen del estómago, *H. pylori* debe estar sujeto a exposiciones periódicas de pH ácido, sobre todo en los períodos de ayuno, donde el pH del mucus baja, y en la etapa inicial de la colonización gástrica.

El principal mecanismo de adaptación desarrollado por *H. pylori* para tolerar el ambiente ácido es la expresión de una actividad ureasa muy eficiente, que le permite la neutralización del medio inmediatamente circundante, hidrolizando la urea presente en las secreciones gástricas para producir CO_2 y NH_3 (Dunn y col., 1990; Meyer-Rosberg y col., 1996; Rektorschek y col., 1998). La ureasa se encuentra en el citoplasma y sobre la

superficie de *H. pylori* tanto *in vivo* como en cultivos en fase estacionaria de crecimiento (Dunn y col.,1997a,b; Tsuda y col.,1994). La capacidad de *H. pylori* para sobrevivir a exposiciones de pH ácido depende de una combinación de la actividad ureasa citoplasmática y de superficie.

En un estudio realizado por Bijlsma y col. (1998), mutantes generados por exposición a la radiación UV, positivos para ureasa, crecieron de igual forma que la cepa parental sobre placas a pH 7, pero no crecieron igual cuando se hizo sobre placas a pH 5. Estudios complementarios con los mutantes y la cepa silvestre, sugirieron que en *H. pylori* existe un sistema de resistencia al ácido independiente de urea, que probablemente depende de la expresión de más de un gen y está involucrado en el crecimiento a pH bajo.

El metabolismo de glucosa en *H. pylori* permanece activo a pHs ambientales entre 3,5 y 8,6 y la actividad de la ureasa citoplasmática permite el metabolismo de la glucosa entre pH 2,5 a 4, manteniendo el pH periplasmático en 6,2. Por otro lado, la ureasa asociada a la superficie disminuye la sobrevivencia de *H. pylori* a pH neutro (Recktorschek y col.,1998).

Además de la producción de ureasa, *H. pylori* ha desarrollado otros mecanismos de homeostasis de pH. En muchas bacterias, la ATPasa F_1F_0 que transloca protones es una enzima importante para regular el pH intracelular y sintetizar ATP. En células que respiran, la transferencia de electrones a través de la cadena transportadora hacia aceptores adecuados está acoplada a la extrusión de protones y la creación de un gradiente electroquímico de protones de transmembrana. La estrategia básica de *H. pylori* es mantener la fuerza protón motriz (FPM) ajustando la diferencia de potencial a través de la membrana citoplasmática para compensar los cambios en el gradiente de pH (Meyer-

Rosberg y col., 1996; Sachs y col., 1996). Esta FPM se usa para convertir la energía en ATP a través de la ATPasa F_1F_0 ; así, la FPM se mantiene en un nivel bastante elevado para permitir la síntesis de ATP en un rango amplio de pH externo.

H. pylori puede crear un potencial de membrana interno positivo ya sea concentrando cationes o bombeando aniones hacia afuera. Tomb y col. (1997), sugirieron que la primera estrategia es más probable dado que no está claro el mecanismo para el eflujo de aniones. Además, tres ATPasas que translocan protones del tipo P han sido identificadas: CadA, CopA y la ATPasa 115. Inicialmente se pensó que estas ATPasas estaban implicadas en la regulación de pH extruyendo protones desde el citoplasma pero Tomb y col. (1997) sugirieron que ellas estaban más estrechamente relacionadas al transporte de cationes bivalentes. Hay acuerdo de que están involucradas en la importación de cationes bivalentes y eliminando metales tóxicos más que en la regulación del pH. Los ORFs HP1552 y HP1183 son similares a los genes que codifican los antiportadores de Na^+/H^+ en *E. coli* y en *Enterococcus hirae*, respectivamente. Estos sistemas de transportadores acoplados a H^+ son responsables de controlar el flujo de iones dentro y fuera de las células y también podrían tener una función en la regulación del pH en *H. pylori*.

Las aminas básicas, productos de la descarboxilación de aminoácidos, proveen un importante mecanismo de protección para las bacterias que viven bajo condiciones de bajo pH. Específicamente en *H. pylori* pueden estar involucradas en la homeostasis de pH. El gen *hp0422*, homóloga a *speA*, que codifica la arginino descarboxilasa en *E. coli*, puede ser importante en la regulación de pH utilizando los productos de la biodegradación de las proteínas.

Otro mecanismo de adaptación al pH ácido es la hidrólisis de la arginina por la arginasa para la generación de urea. Recientemente, se ha caracterizado la actividad arginasa en *H. pylori*, cuya enzima está codificada en el ORF HP1399, el cual es ortólogo al gen *rocF* de *B. subtilis* que codifica para la arginasa (McGee y col., 1999). Esta enzima participa en el ciclo de la urea y, en *H. pylori*, también se encuentra involucrada en el metabolismo del nitrógeno (Mendz y Hazell, 1996). Estudios realizados en *H. pylori* mostraron que un mutante *rocF* era aproximadamente 1.000 veces más sensible a la exposición al ácido que la cepa silvestre y que esta sensibilidad de la mutante al ácido no es revertida por la presencia de arginina (McGee y col., 1999), sugiriendo que *rocF* en *H. pylori* es importante para la protección al ácido.

Las investigaciones sobre los mecanismos de resistencia al estrés ácido independientes de la actividad ureasa, han llevado a la identificación de genes cuya expresión es inducida después de la exposición al pH ácido. Un estudio muestra que la exposición de *H. pylori* a un pH ácido induce la producción de la proteína activante de neutrófilos (NapA) y de la alquilo hidroperóxido reductasa (TsaA), sin embargo, no se detectaron cambios en el nivel de transcripción de los respectivos genes. Una posible explicación es que el efecto del ácido sobre estas proteínas refleja una redistribución de su localización, una alteración en sus propiedades físicas o cambios en los niveles de traducción o degradación (McGowan y col., 1997).

Otro mecanismo inducible de adaptación al estrés de pH propuesto en *H. pylori* es la expresión de algunas proteínas involucradas en la unión de la bacteria al epitelio gástrico (Huesca y col., 1998). En este sentido, se ha identificado la Hsp70 como una proteína inducida por el estrés ácido y que actuaría como una posible adhesina. Del mismo modo, se

ha propuesto que la Hsp60 podría participar en la protección y regulación de la expresión de la ureasa (Evans y col., 1992)

Otro de los genes inducidos es el *hp0045* que codifica para la proteína WbcJ cuyo peso molecular predicho es de 34,8 kDa. Ésta es homóloga a proteínas bacterianas de biosíntesis del antígeno O involucradas en la conversión de manosa-GDP a fucosa-GDP. Un mutante isogénico *wbcJ* que expresa el antígeno O y los determinantes Lewis^x o Lewis^y fue más sensible al estrés ácido que la cepa parental. La pérdida de expresión del antígeno O puede también afectar la expresión de varias proteínas de superficie necesarias para la tolerancia. Además, se observaron diferencias cualitativas en los perfiles de LPS entre células de *H. pylori* crecidas a pH 5 y pH 7, sugiriendo que *H. pylori* puede alterar la estructura de su LPS en respuesta al pH ácido (McGowan y col.,1998). Ésta puede ser una importante respuesta adaptativa que facilita la colonización de *H. pylori* al ambiente ácido del estómago, dado que el microorganismo puede alterar la estructura de sus LPS haciéndolos más resistentes al ácido en respuesta al bajo pH, debido quizás a que la composición de antígeno O puede alterar la permeabilidad de la membrana cambiando la carga superficial.

La vía de reparación de DNA por escisión de nucleótidos contribuye a reparar el daño producido por el ácido en esta molécula. Un mutante isogénico *uvrB* de *H. pylori* construido mediante la inserción de un cassette de resistencia a kanamicina en *uvrB* mostró un gran incremento en sensibilidad a agentes que dañan el DNA como metilmetanosulfonados o radiación UV, igual como ocurre con mutantes *uvrB* negativos de otras especies bacterianas. El bajo pH fue significativamente más letal para el mutante *uvrB* que para la cepa silvestre, sugiriendo que esta vía de reparación por escisión de nucleótidos de

H. pylori está envuelta en la reparación del daño en el DNA inducido por ácido (Thompson y col., 1998).

En *H. pylori* el pH del microambiente del hospedero también parece ser una señal que puede cambiar la expresión de algunos genes de virulencia, proteínas de membrana externa o proteínas del tipo sensor-regulador (Olson y col.,1993). Por ejemplo, las células de cepas *cagA*+ de *H. pylori* crecidas a pH 6 durante 48 h, inducen al máximo la expresión de *cagA*, y esto se relaciona con la mayor susceptibilidad de estas cepas a pH 3 que las cepas silvestres *cagA* o knock-outs isogénicos *cagA*. Estos datos sugieren que *H. pylori* presenta una susceptibilidad diferencial al ácido que puede contribuir a la colonización preferencial de cepas particulares de *H. pylori* en nichos específicos de la capa mucosa (Karita y cols, 1996).

Los datos experimentales muestran que muchos mecanismos han sido desarrollados por *H. pylori* para regular el pH interno y responder a las condiciones ácidas. Los datos obtenidos desde el análisis del genoma concuerdan con estas observaciones y sugieren nuevas áreas para ampliar la investigación acerca de la resistencia al ácido de la bacteria.

1.4 Ácidos orgánicos y la respuesta de tolerancia al ácido.

La exposición a AOCC es otra condición de estrés a la que se ven enfrentadas las bacterias enteropatógenas durante su ciclo de vida. Uno porque los AOCC se encuentran presentes en grandes cantidades en el tracto gastrointestinal y además porque han sido ampliamente usados como preservantes de alimentos.

La exposición a AOCC tales como ácido acético, propiónico y butírico a pH neutro o cercano a la neutralidad, incrementan la sobrevivencia al ácido de *E. coli* y *S. typhimurium* (Guilfoyle y Hirschfield, 1996; Kwon y Ricke, 1998). Los estudios realizados en *S. typhimurium* indican que la resistencia al ácido se encuentra muy incrementada después de la exposición de este microorganismo a dichos ácidos y la inducción, mediada por estos agentes químicos, es además incrementada por una exposición adicional a pH ácido, anaerobiosis y/o una prolongada exposición a los AOCC. Otra observación señala que la exposición a una mezcla de estos ácidos orgánicos incrementa la tolerancia de la bacteria al estrés por alta osmolaridad (Kwon y Ricke, 1998). También se sugiere que la exposición de *S. typhimurium* a estos ácidos orgánicos incrementa la virulencia de este patógeno por su capacidad de aumentar su resistencia al ácido.

Estudios realizados recientemente en *E. coli*, utilizando matrices de genes (gene arrays) para investigar las bases de la tolerancia al ácido inducida por acetato, mostró que la bacteria reprime la expresión de 60 genes. De estos, 48 corresponden a genes que codifican para componentes de la maquinaria transcripcional. Por otra parte 26 genes incrementan su expresión, de los cuales 6 de ellos se conoce son importantes para la sobrevivencia de la bacteria a bajo pH. Cinco de estos genes, al igual que otros 6 inducidos por el acetato, son miembros del regulón RpoS de *E. coli* (Arnold, 2001). El factor RpoS, como se mencionó anteriormente, se sabe que es necesario para la inducción de la tolerancia al ácido.

Otros estudios realizados en *Vibrio cholerae* muestran que este patógeno también presenta una respuesta de tolerancia al ácido, ATR, que se divide en un mecanismo ATR inorgánico y ATR orgánico. En *V. cholera* se ha demostrado que el regulador transcripcional ToxR es necesario para la respuesta ATR orgánica de manera independiente de ToxT. Por otra parte,

el análisis de las proteínas de esta bacteria mediante electroforesis bidimensional después de ser sometida a un estrés por ácidos orgánicos mostró que al menos 100 proteínas alteran su expresión (Merrell y col., 2001). De éstas, más de 20 polipéptidos modifican su expresión en una mutante *toxR* comparada con una cepa silvestre. Además, la expresión de la porina OmpU parece ser suficiente para evitar el efecto de la mutante *toxR* sobre la respuesta ATR, señalándose que OmpU tendría alguna función en la respuesta de resistencia a los ácidos orgánicos en este microorganismo (Merrell y col., 2001).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

H. pylori posee un mecanismo de tolerancia al ácido independiente de la actividad ureasa, inducible por ácidos inorgánicos y orgánicos y regulado por el factor transcripcional Fur.

Objetivo General:

Se propone caracterizar el mecanismo de respuesta de tolerancia al ácido, ATR, en *H. pylori* y estudiar la función del regulador transcripcional Fur.

Objetivos Específicos:

1. Construir una cepa mutante *fur* de *H. pylori* ATCC43504 mediante la inserción de un marcador de resistencia a cloramfenicol.
2. Análisis del proteoma de las cepas de *H. pylori* 43504 y su mutante isogénica *fur* mediante geles bidimensionales frente a condiciones de estrés ácido.
3. Caracterizar la respuesta de tolerancia al ácido en las cepas de *H. pylori* 43504 y su mutante isogénica *fur* luego del tratamiento con ácidos inorgánicos y orgánicos de cadena corta.

3. MATERIALES

3.1 Cepas bacterianas utilizadas

H. pylori ATCC43504 (*cag+*,*ure+*) obtenida desde la ATCC y aislada desde un paciente australiano con úlcera péptica.

H. pylori DW504 *ureI* (*kan^r*) facilitada por el Dr. G. Sachs (Weeks y cols, 2000).

H. pylori ATCC 700392, que corresponde a la cepa 26695 secuenciada (Tomb y cols, 1997).

H. pylori FUR504 mutante *fur* negativa, isogénica de la cepa ATCC43504, construida en este trabajo.

E. coli DH5 α (Φ 80 *d_{lacZ}* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, F' *end A1*, *gyr A96* ,*thi-1*, *hsd R17* (*r_k⁻*,*r_k⁺*) , *sup E44*, *rel A1*) de Gibco BRL

3.2 Medios de cultivo

Agar Luria-Bertani

BactoTryptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	15 g/l

Caldo Luria-Bertani

Bacto triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l

Agar Soya triptona (TSA).

Agar TSA	36 g/l
Sangre de cordero o suero de caballo	45 ml/l
Isovitalex	3 ml/l
Dent	4 ml/l

Caldo Brucella

Medio Brucella	30 g/l
Suero de caballo	50 ml/l (5%)

3.3 Antibióticos.

Ampicilina:	100 µg/ml	<i>E. coli</i>
Cloramfenicol:	50 µg/ml	<i>E. coli</i>
	20 µg/ml	<i>H. pylori</i>
Kanamicina:	20 µg/ml	<i>H. pylori</i>

Todos los antibióticos se prepararon como soluciones acuosas y se esterilizaron mediante filtración a través de filtros Millipore de 0,22 µm.

3.4 Reactivos

Los reactivos usados se obtuvieron de los siguientes proveedores:

Gibco BRL, Maryland, USA: agarosa, extracto de levadura, tris base, peptona 140, kanamicina sulfato, urea, EDTA, glicina, suero de caballo, endonucleasas de restricción (*EcoRV*, *HindIII*, *PstI*), dNTPs, Taq DNA polimerasa, fosfatasa alcalina (CIAP), polinucleótido kinasa del fago T4, DNA ligasa del fago T4, marcador de tamaño de DNA 1 kb.

Bio-Rad Laboratories Inc., Melville, N Y, USA: SDS, acrilamida, azul de bromofenol, persulfato de amonio, bis acrilamida, anfolito3/10.

Winkler Ltda: cloruro de magnesio, TEMED, β-mercaptoetanol, mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), glicerol, alcohol etílico, cloroformo, alcohol isopropílico, hidróxido de sodio, cloruro de sodio, glicina, tris, ácido fosfórico.

Sigma Chemicals Co. , St Louis, USA: persulfato de amonio, ácido n-butírico, bromuro de etidio, NP-40,

Oxoid, England: Campygen, suplemento antibiótico Dent.

Becton Dickinson and Company, USA: suplemento nutritivo Isovitalex, Agar soya triptona, caldo soya triptona.

Difco Lab, USA: agar granulado.

Merck Ltda, Chile. : metanol, acetona, ácido acético.

NEN: [S³⁵]-metionina.

Promega Life Sciences, Inc, USA: kit de purificación de plasmidio "Wizard Plus Maxiprep", IPTG, X-Gal.

New England Biolabs: Inc., Beverly MA., USA: endonucleasas de restricción (*SmaI*, *EcoRI*).

Laboratorio Chile S.A.: ampicilina, penicilina.

Instituto de Salud Publica de Chile: sangre desfibrinada de cordero.

Integrated DNA Technologies, Inc: oligonucleótidos .

3.5 Plasmidios:

Se utilizó como vector de clonamiento el plasmidio pUC19 de New England Biolabs Inc.

Plásmido pBSC103 que contiene el gen de resistencia a cloramfenicol (*cat*) de *Campylobacter coli* (Wang y Taylor, 1990), cedido por el Dr. Douglas Berg, del Departamento de Microbiología Molecular de la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington, en San Luis, U.S.A.

3.6 Partidores

A continuación se indican los partidores utilizados como iniciadores de la reacción de amplificación del gen *fur* de *H. pylori*

FUR1 5' TATCTGGCGCGCTTGATTGC 3'

T_m (50 mM NaCl): 59,66°C

FUR2 5' GGGGGGCTCGAG/GCAGTCAAACAAATCGCCTACC 3'

T_m (50 mM NaCl): 72,64°C

FUR4 5' GTCGTTAAAGCGCCCAAAGG 3'

T_m (50 mM NaCl): 57, 90°C

4. MÉTODOS

4.1 Almacenamiento y cultivo de las cepas bacterianas. Las cepas de *H. pylori* se cultivaron sobre placas agar-soya triptona, suplementadas con 5% de suero de caballo o sangre desfibrinada de cordero, suplemento nutritivo Isovitalex y el suplemento selectivo Dent, en un incubador de atmósfera controlada (5,5% CO₂, 70% humedad) a 37°C. Las cepas se traspasaron diariamente a placas frescas y cuando fue requerido, las placas se suplementaron con cloramfenicol (20 µg/ml) o kanamicina (20 µg/ml). Luego de 48 h de crecimiento, una masa de bacterias equivalente a un cuarto de placa se cosechó con un asa plástica estéril y suspendió homogéneamente en 1 ml de amortiguador fosfato-salino pH 7,2 (PBS: 0,2 g/l KCl, 80 g/l NaCl, 0,2 g/l KH₂PO₄ y 1,15 g/l de Na₂HPO₄, pH 7,2). A continuación las muestras se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min a 4°C, por dos veces en una microfuga Eppendorf. El sedimento bacteriano se resuspendió en 300 µl de caldo soya triptona suplementado con 20% de glicerol para ser almacenadas a -80°C.

La cepa de *E. coli* DH5α transformada y no transformada se creció en medio LB a 37°C durante la noche con el correspondiente antibiótico, según el vector utilizado. Alícuotas de 50, 100 y 150 µl se sembraron en placas agar LB para la mantención de las colonias durante períodos cortos de tiempo.

4.2 Crecimiento de *H. pylori* en medio líquido. Para los experimentos de crecimiento de *H. pylori* en medio líquido, las células se crecieron durante 24 h sobre placas de agar soya triptona, con los suplementos anteriormente indicados. Las células cosechadas se lavaron por centrifugación durante 10 min a 10.000 rpm en amortiguador PBS y se resuspendieron en 1 ó 2 ml de amortiguador PBS hasta alcanzar una suspensión de 3×10^8 células/ml. Las células así tratadas se crecieron en medio

líquido Brucella pH 7,0 o pH 5,7, ajustado con HCl 0,5 N, suplementado con 10 % de suero fetal bovino, suplemento antibiótico Dent e Isovitalax. El medio se esterilizó mediante filtración a través de una membrana de tamaño de poro de 0,2 μm . Alícuotas de 15 ml de este medio, contenidos en matraces estériles de 100ml de capacidad, se inocularon con 150 μl de la suspensión anterior para dar una concentración inicial aproximada de 10^6 células/ml ó $\text{DO}_{560} = 0,015$ U.

Los caldos inoculados se crecieron en jarras Gaspack y el ambiente de microaerofilia se logró introduciendo sobres de microaerofilia Campygen (Oxoid). Los cultivos se desarrollaron en forma continua con agitación suave a 37°C durante 72 h y los sobres productores de microaerofilia se renovaron cada 24 h, cada vez que se midió la DO.

El crecimiento de los cultivos de *H. pylori* se determinó midiendo la absorbancia a 560 nm o contando el número de colonias sobre placas de agar soya triptona, a las 0, 24, 48 y 72 h.

4.3 Preparación de DNA cromosómico de *H. pylori*. El DNA cromosomal de *H. pylori* se purificó según el método descrito por Clayton y Mobley (1997). Básicamente, una suspensión de *H. pylori* crecidas durante 24 h en 900 μl de amortiguador Tris-EDTA (TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), se centrifugó en una microfuga Eppendorf a 14.000 rpm durante 5 min. El sedimento bacteriano se resuspendió en 576 μl de amortiguador TE. Luego, se adicionó 30 μl de SDS al 10% y 3 μl de Proteinasa K 20 mg/ml. La mezcla se agitó vigorosamente e incubó durante 1 h a 37°C . Después de la incubación se agregó a la mezcla 100 μl de NaCl 5M y 80 μl de solución CTAB/NaCl (4,1 g de NaCl y 10 g de CTAB para 100 ml de solución) y se incubó por 10 minutos a 65°C . A continuación se adicionó un volumen equivalente de mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó la muestra por 5 min a 14.000 rpm. La fase acuosa se traspasó a un tubo limpio y se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1),

se agitó y centrifugó por otros 5 min. Nuevamente la fracción acuosa se transfirió a un tubo limpio y se adicionó 0,6 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. La precipitación se desarrolló a 5° C durante 30 min. Luego, para recuperar el precipitado la mezcla se centrifugó a 14.000 r.p.m. por 10 min y el sedimento de DNA se lavó dos veces con etanol al 70%. Finalmente, el DNA se resuspendió en agua bidestilada y almacenó a -20° C para su posterior utilización.

4.4 Preparación del DNA plasmidial. Purificaciones a pequeña escala de DNA plasmidial se lograron utilizando el kit comercial "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" de acuerdo al protocolo establecido por los fabricantes.

4.5 Amplificación del gen *fur* de *H. pylori* mediante la técnica de PCR. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl en solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 mM de cada desoxirribonucleósido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), partidores a una concentración final de 1 µM, 0,2 unidades de *Taq* polimerasa y 0,1 ó 0,5 µg de DNA cromosomal de *H. pylori*, durante 35 ciclos de amplificación en un termociclador MJ Research. Cada ciclo consistió en 40 s a 94° C (desnaturación), 40 s a 58° C (hibridación) y 1min por cada 1 kb de DNA a 72° C (elongación). Al finalizar, las muestras se mantuvieron a 4° C hasta ser analizadas.

4.6 Digestiones de DNA con endonucleasas de restricción. Según el propósito de la digestión, se incubaron entre 10 a 30 µg de DNA con 5 a 30 U de enzima de restricción en un volumen final de 100 µl en el correspondiente amortiguador, por un mínimo de 1 h hasta un máximo de 12 h. La temperatura de incubación fue de 37° C. El progreso de las digestiones se analizó mediante

electroforesis en geles de agarosa al 1% tomando alícuotas de la mezcla de reacción. Una vez finalizada la digestión, el total de los fragmentos de DNA obtenidos se separó por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, para su posterior purificación.

4.7 Electroforesis en geles de agarosa. La separación de los fragmentos de DNA entre 0,5 y 3,0 kb se realizó por electroforesis en geles de agarosa horizontal al 1% preparados en solución TAE 0,5X (TAE 50X: 242 g/l de Tris base, 57,1 ml/l de ácido acético glacial, 100 ml/l de EDTA 0,5 M, pH 8,0). Los geles se sometieron a electroforesis en solución TAE 0,5X a 50 mA. Las muestras se suspendieron en solución de carga 2X (glicerol 25%, SDS 0,5% y azul de bromofenol 0,025%).

4.8 Determinación de la concentración de DNA. La concentración de DNA en las muestras se determinó espectrofotométricamente a 260 nm. Se consideró la razón 280/260 como indicador del grado de pureza de la muestra. La relación utilizada fue de 1 unidad de absorbancia = 50 µg/ml de DNA de doble hebra y 20 µg/ml de DNA de hebra simple (Sambrook y cols., 1989).

4.9 Purificación de DNA desde geles de agarosa. Los fragmentos de DNA obtenidos a partir de las digestiones con enzimas de restricción se separaron electroforéticamente en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en tampón TAE 1X modificado (TAE 50X: 242 g/l de Tris base, 57 ml/l de ácido acético glacial, 100 ml/l de EDTA 0,05 M, pH 8,0). Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV y compararon con el estándar de peso molecular (pBR322 digerido con *HindIII*). Las bandas de interés se escindieron del gel y eluyeron a través de una columna de separación mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 15 min. El DNA se precipitó adicionando 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol al 100%. Para lograr una

mejor precipitación, se agregó 1 µl de glucógeno (20 mg/ml) por cada 50 µl de volumen de muestra. La precipitación se llevó a cabo durante 12 h a 5° C luego de lo cual se centrifugó durante 10 min a 14.000 rpm, y el precipitado se lavó 2 veces con etanol frío al 70%.

4.10 Purificación de DNA a partir de reacciones de PCR. Los fragmentos de DNA obtenidos a partir de amplificaciones por la técnica de PCR se purificaron con el kit “Wizard™ PCR Preps DNA Purification System”. Para asegurar la calidad de las muestras, el DNA se precipitó tal como se indicó anteriormente. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en agua estéril y se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa.

4.11 Tratamiento de DNA con la Polimerasa del fago T4. Para obtener fragmentos con extremos romos, los fragmentos de DNA de extremos cohesivos se trataron con la DNA polimerasa del fago T4 según el método descrito por Weiss y cols. (1968) con las modificaciones que se señalan a continuación. La mezcla de reacción consistió de 20 a 30 µg de DNA, 10 µl de amortiguador de reacción 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 7,6, MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM y PEG 20%), 0,5 µl de una mezcla de desoxirribonucleósidos trifosfato 25 mM cada uno y 2 U de la DNA polimerasa del fago T4 en un volumen final de 50 µl. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 16° C, luego de lo cual la enzima se inactivó por 5 min a 65° C.

4.12 Fosforilación de insertos. En la misma mezcla de reacción una vez finalizada la reacción para obtener extremos romos, se adicionaron 2 µl de ATP 50 mM y 40 U de polinucleótido kinasa del fago T4. La enzima cataliza la transferencia del fosfato y del ATP al grupo hidroxilo 5' del DNA (Maxam A. y cols., 1977). La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 37° C. Luego, la reacción

fue detenida inactivando la enzima durante 10 min a 65°C. Los fragmentos de DNA se purificaron con el kit "WizardTM DNA Clean-Up System" de Promega, según las indicaciones del proveedor.

4.13 Desfosforilación de vectores plasmidiales. Para remover los fosfatos de los extremos 5' y evitar la autoligación de los vectores digeridos con enzimas de restricción, los fragmentos de DNA se trataron con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) de acuerdo a las indicaciones de Sambrook y col. (1989) y Ausubel y col. (1987). Para esto se tomaron 10 µl de DNA a desfosforilar (1 a 20 µg), 5 µl de solución amortiguadora 10X para CIAP (Tris HCl 500 mM pH 8,5 y EDTA 1 mM), MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM y 1 U de CIAP para un volumen final de 50 µl. Esta mezcla se incubó a 37° C durante 15 min, luego de lo cual la enzima se inactivó por 15 min a 56° C. Entonces, se adicionó de nuevo 1 U de enzima y se repitió la reacción en las mismas condiciones. La reacción se detuvo agregando 1 µl de EDTA 0,5 M y calentando a 65° C por 20 min. El DNA se purificó usando el kit "WizardTM DNA Clean-Up System" de Promega.

4.14 Ligación de fragmentos de DNA. La metodología utilizada se fundamentó en la técnica descrita por Weiss y cols. (1968) y Sambrook y cols. (1989) con algunas modificaciones.

Luego de digerir, tanto el inserto de DNA como el vector a utilizar, con las enzimas de restricción, se mezclaron ambos en un tubo Eppendorf en un volumen final de 50 µl en una relación molar de 4:1 (inserto: vector), respectivamente. Luego, se adicionaron 5 µl de solución amortiguadora para ligación 10X (Tris-HCl 300 mM, pH 7,8; MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM y ATP 10 mM), PEG al 2% y 3 U Weiss de DNA ligasa del bacteriófago T4 y agua bidestilada estéril hasta completar el volumen especificado anteriormente. Todas las reacciones se llevaron a cabo durante 16 h a 16° C.

4.15 Preparación de células electrocompetentes. Las células competentes se prepararon de acuerdo al método de Miller (1994).

4.16 Transformación bacteriana con DNA plasmidial

4.16.1 Transformación natural de *H. pylori*: El protocolo de transformación se basa fundamentalmente en el descrito por Zhongming y Taylor (1997) con las modificaciones descritas a continuación.

Un cultivo fresco realizado en placa se cosechó y suspendió en 1,5 ml de glicerol frío al 10%. Las células se colectaron mediante centrifugación a 6.000 rpm por 10 min a 4° C. Después, el precipitado celular se lavó una vez más en las mismas condiciones y el precipitado se resuspendió en 200 µl de glicerol frío al 10% y se adicionó entre 0,5 a 1 µg de DNA. A continuación, la mezcla se incubó durante 5 min en hielo y posteriormente la suspensión se esparció en un diámetro máximo de 20 mm en una placa de agar soya triptona e incubó en ambiente de microaerofilia a 37° C durante 12 h. Después de este período, las células se cosecharon cosechadas y suspendieron en tampón fosfato salino pH 7,2. Alícuotas de 50, 100 y 150 µl de la suspensión celular se esparcieron en placas de selección que contenían cloramfenicol 20 µg/ml e incubaron entre 3 a 5 días, hasta la aparición de colonias.

4.16.2 Electrotransformación de *E. coli* DH5a: La electrotransformación de *E. coli* DH5a se realizó básicamente según el método descrito por Chasy y cols.,(1998), con algunas modificaciones introducidas por Miller (1994). A un tubo Eppendorf con 20 µl de células competentes se le adicionó 0,1 a 0,5 µg de DNA plasmidial. Se mantuvo en hielo por 5 min y se traspasó a una cubeta estéril de electroporación. Se utilizó un equipo de "Life Technologies BRL". Las condiciones

fueron: voltaje 400 V, resistencia 4.000 Ω y capacitancia 330 μ F. Luego de aplicar el pulso, se retiró la cubeta de la cámara, colocándose inmediatamente en hielo y las células se diluyeron con 800 μ l de caldo Luria Bertani estéril. Luego de incubar las células por 1 h a 37° C se sembraron alícuotas de 50, 100 y 150 μ l en placas LB-agar con ampicilina 100 μ g/ml ó 50 μ g/ml de cloramfenicol según el cassette de resistencia que portara el plásmido

4.17 Preparación de la muestra para electroforesis bidimensional. Las células marcadas con [S^{35}]-metionina se obtuvieron mediante centrifugación durante 5 min a 10.000 rpm. El sedimento bacteriano se resuspendió en 1 ml de buffer PBS, centrifugó y resuspendió en 300 μ l de amortiguador de sonicación (Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4, $MgCl_2$ 5 mM y ribonucleasa A 50 μ g/ml). Las muestras se sonicaron en un aparato 60 Sonic Desmembrater de Fisher Scientific, con una potencia de 20 W a intervalos de 30 s por 3 veces, entre los cuales las muestras fueron mantenidas en hielo. Los lisados resultantes se secaron al vacío a 65° C durante aproximadamente 1 h en un equipo DNA Speed Vac DNA, 110 de Savant y se mantuvieron finalmente a -20° C para su posterior análisis.

4.18 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. Los procedimientos siguientes y las soluciones stock para el desarrollo de la metodología de electroforesis bidimensional son descritos por O' Farrel (1975).

4.18.1 Primera dimensión: La resolución de proteínas en primera dimensión se logró inicialmente mediante la técnica de isoelectroenfoque al no-equilibrio en geles de poliacrilamida (NEPHGE). Para ello, capilares de vidrio de 130 mm X 2,5 mm de diámetro interno, se cargaron hasta 115 mm

con una mezcla compuesta de urea 9,5 M, 2% Nonidet P-40, 4% de acrilamida/bis- acrilamida y 2% de anfolitos de un rango de pH entre 3-10. Los geles de isoelectroenfoque se polimerizaron con 10 μ l de persulfato de amonio (10%) y 7 μ l de N,N,N',N' tetremetiletilendiamina (TEMED) por cada 10 ml de mezcla. Luego de lo cual se cubrieron con 20 μ l de H₂O y polimerizaron durante 12 h a temperatura ambiente.

La muestra a analizar se resuspendió en 25 μ l de tampón de lisis (urea 9,5 M, NP-40 2%, anfolitos 2% pH 3-10 y 5% de β -mercaptoetanol) la que se cargó en el extremo superior de los capilares. Sobre ella se adicionó 15 μ l de "amortiguador de muestra": (10% de glicerol, 5% de β -mercaptoetanol, 2,3% de SDS y Tris-HCl 0,0625 M, pH6,8). Para desarrollar la electroforesis, la cámara inferior (ánodo) del aparato de electroforesis de primera dimensión contenía una solución de NaOH 0,02 M y la cámara superior (cátodo) una solución de ácido fosfórico 0,01 M. El procedimiento se realizó a 400 V durante 5,5 h.

Del mismo modo se realizaron geles en condiciones de equilibrio mediante la técnica de O'Farrell (). En estas condiciones el gel de primera dimensión se prepara de la misma forma que se describió para el NEPHGE excepto, que los anfolitos se utilizan en una mezcla del 0,2% anfolito pH 3-10 y 0,8 % anfolito pH 5-7. Para alcanzar el equilibrio, los geles se precorren a 200 V por 10 min, luego a 300 V por 15 minutos y 400 V por 15. En el cátodo se utiliza una solución de NaOH 0,02 M y en el ánodo una solución de H₃PO₄ 0,01 M. Posteriormente se cargó la muestra y los geles se corrieron por 7.200 Vh. Al final de la corrida, los geles se removieron de los capilares por extrusión y equilibraron en 5 ml de amortiguador de muestra SDS durante 1 h a temperatura ambiente.

4.18.2 Segunda dimensión: La segunda dimensión es el sistema de electroforesis en geles de poliacrilamida al 11,5 % en presencia de SDS descrito por Laemmli (1970). Después del equilibrio

de los geles de la primera dimensión, estos se ubicaron sobre el gel concentrador y se fijaron a éste con una solución de agarosa al 1%, que contenía cantidades traza de azul de bromofenol. La electroforesis se desarrolló durante 16 h a 40 V. Posteriormente, los geles se fijaron y tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 0,1%, en ácido acético al 10% y metanol al 50% durante 30 min y posteriormente se decoloraron con una solución compuesta por metanol al 25% y ácido acético 7,5%.

4.19 Análisis cuantitativo de expresión de proteínas. Para analizar los geles, éstos se secaron sobre un papel filtro Whatman y así fueron expuestos sobre una pantalla K por 5 días. Las imágenes se capturaron por el equipo "Personal Molecular Imager FX" de BioRad, digitalizadas y procesadas con el programa computacional "Quantity One" de la misma compañía. Las manchas de proteínas se normalizaron en cada gel, utilizando como referencia el factor de elongación EF-Tu.

4.20 Ensayos de adaptación y tolerancia al ácido. Para adaptar las células a una condición subletal de pH ácido, una suspensión de 3×10^8 células/ml en medio RPMI1640 suplementado con metionina y ajustado a pH 6,0, se incubó en condiciones microaerofílicas durante 30 min a 37° C. Después de adaptar las células a pH 7,0 ó 6,0 estas se sometieron a un estrés a pH 3,0 ó 4,0 a distintos tiempos, para medir la respuesta de tolerancia al ácido. Cada vez el pH del medio se ajustó con HCl 0,5 M. En los experimentos donde se utilizó ácidos orgánicos de cadena corta (acético, propiónico o butírico) estos se obtuvieron de soluciones patrones 1 M ajustadas a pH 7,0.

4.21 Determinación de las células viables. La determinación de la viabilidad se realizó de acuerdo al método de Foster y Hall (1991). Después de cada ensayo de adaptación o tolerancia al ácido se

tomó 100 μ l de la suspensión de células y se hizo una serie de 4 diluciones de 10 en 10, de la que se sembró 10 μ l de cada una en sendas placas de agar soya triptona suplementadas con 5% de suero de caballo, en las condiciones ya descritas. Las placas se incubaron durante 4 días hasta obtener colonias que se pudieran contar.

4.22 Análisis estadístico. Los datos representan el valor promedio de al menos tres experimentos independientes y fueron analizados mediante el test estadístico t de Student en los resultados que se mencionen.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis bioinformático del gen *fur* de *H. pylori*

Algunos de los sistemas reguladores que están implicados en la respuesta de adaptación al estrés de pH ácido, en organismos como *S. typhimurium*, *V. cholerae* y *L. monocytogenes*, son OmpR/EnvZ, PhoP/Q, RpoS y el regulador transcripcional Fur (Bearson y col., 1997; Foster y col., 1999). Sin embargo, los genes homólogos para estos reguladores están ausentes en los genomas de las cepas de *H. pylori* J99 y 26695, excepto el regulador Fur, el cual corresponde al ORF HP1027 en la secuencia del genoma de *H. pylori* 26695 (Tomb y cols., 1997). Este ORF presenta una región intergénica de 162 pares de bases en su extremo 5' que lo separa del ORF HP1026, ubicado río arriba, mientras que el ORF HP1028, ubicado río abajo de *fur*, está orientado en forma opuesta, lo que sugiere que el gen se transcribe en un mensajero monocistrónico. Recientemente se ha confirmado que el gen *fur* de *H. pylori* se transcribe desde un promotor único, bajo el control del factor σ^{80} y es regulado por sí mismo en forma dependiente de hierro (Delany y col., 2002).

Estudios estructurales de la proteína Fur de *E. coli*, han permitido establecer dos dominios funcionales, uno de ellos corresponde al dominio amino terminal el cual se une al DNA y sufre cambios conformacionales producto de la unión del ion ferroso a la proteína y el dominio carboxilo terminal que corresponde a la región de la proteína donde se encuentra el sitio de unión al ion ferroso. Fur se une al DNA a través de secuencias específicas, conocidas como cajas FUR, las que se ubican generalmente en las regiones promotoras de

los genes regulados por hierro. El consenso de las cajas FUR en *E. coli* es 5'GATAATGATAATCATTATC3' (Escolar y col., 1999; Coy M. y col., 1991). Sin embargo, hasta el presente no se ha definido un consenso en *H. pylori* para las regiones que interaccionan con Fur.

El análisis de la estructura secundaria de la proteína Fur, con el programa J-Predic (Cuff y col., 1998) muestra que Fur de *H. pylori*, al igual que Fur de *S. typhimurium* y *E. coli*, posee tres hélices de tipo α (H_1 , H_2 , H_3) en la región amino terminal, seguidas por dos hojas beta pequeñas (β_1 y β_2) (Fig. 1A). La tercera hélice, H_3 , conocida como hélice de reconocimiento, es esencial para la interacción de la proteína con el DNA, la que se inserta en el surco mayor. Se sugiere que el par de hojas β podrían constituir parte de la unidad de unión al DNA y formarían un "loop" que media el contacto secundario con el DNA (González de Peredo, 2001).

Estudios recientes mostraron que el cambio de la histidina 99 por isoleucina (H99I), en Fur de *H. pylori*, impedía el cambio conformacional necesario para la unión de la proteína al DNA. Esto se explica porque este aminoácido actúa como ligando para la unión del ion ferroso (Delany y col., 2002). Este resultado es coincidente con los datos obtenidos con Fur de *S. typhimurium*, donde experimentos de mutación sitio dirigida a la H90 provocan el mismo efecto (Hall y Foster, 1996). La proteína Fur de *H. pylori* posee un segundo sitio de unión a metal en el dominio carboxilo terminal, el sitio de unión a Zinc, CysXYCysGly. Este mismo motivo de unión también se encuentra en Fur de *S. typhimurium* y *E. coli* (Fig. 1 A) (Foster y col., 1996; González de Peredo y col., 1999).

El alineamiento de la secuencia aminoacídica de Fur de *S. typhimurium* con el de *H. pylori* revela que entre las dos proteínas existe un 30% de identidad (Fig. 1B). Los estudios de tolerancia al ácido en *S. typhimurium* (Hall y Foster, 1996) permitieron aislar mutantes de Fur que perdían la capacidad de regular la expresión de los genes requeridos para mantener la homeostasis de hierro, sin alterar su función como regulador de la respuesta de tolerancia al ácido. Este resultado indicó que la función de Fur en la regulación de la respuesta de tolerancia al ácido (ATR) puede estar en un dominio separado en la proteína, del dominio implicado en la función de la regulación de la homeostasis de hierro. También, se logró identificar algunos aminoácidos que son específicos para la función reguladora de la respuesta ATR. Al comparar las secuencias aminoacídicas de la proteína Fur de *H. pylori* con la secuencia aminoacídica de Fur de *S. typhimurium* encontramos que al menos dos aminoácidos de los señalados por Foster, en la proteína de *S. typhimurium*, se conservan en la secuencia de la proteína de *H. pylori*. Uno de ellos es H99, equivalente a la H90 en el Fur de *S. typhimurium* ubicada en la región de unión a hierro de la proteína, y la R66, equivalente a R57 en *S. typhimurium* ubicada dentro de la hélice H3 que interacciona con el DNA (Figuras 1A y 1B). De estos aminoácidos, mutaciones en la R57 de la proteína de *S. typhimurium* no alteran la función reguladora de la homeostasis de hierro.

Estos antecedentes señalan una gran homología estructural entre las proteínas Fur de *H. pylori* y *S. typhimurium* por lo que es lícito pensar que Fur de *H. pylori* puede estar implicado en la respuesta de tolerancia al ácido además de controlar la homeostasis de hierro.

5.2 Construcción de una cepa mutante *fur* de *H. pylori*

Con el propósito de investigar la función de la proteína Fur en la respuesta ATR, en *H. pylori*, se construyó un mutante isogénico *fur*-negativo de la cepa ATCC43504, mediante intercambio alélico con el plásmido pUCFUR*. Esto dió como resultado la inactivación del gen *fur* mediante la inserción de un cassette de resistencia a cloramfenicol (*cat*). La estrategia de clonamiento se muestra en la figura 2. Para ello, el gen *fur* se amplificó mediante PCR a partir del DNA cromosomal de la cepa ATCC700392 con los partidores FUR1 y FUR2, obteniéndose un fragmento esperado de 1.500 pb. El producto de amplificación se purificó con el kit comercial, "WizardTM PCR Preps DNA Purification System". Posteriormente se ligó al vector de clonamiento pUC19 digerido con la enzima de restricción *SmaI*, obteniéndose el plásmido pUCFUR. Paralelamente, se obtuvo el gen de resistencia a cloramfenicol (*cat*), de *C. coli*, a partir del plásmido pBSC103 digerido con las enzimas *PstI* y *EcoRI*. Este gen tiene un tamaño de 1,2 kb, posee su propio promotor, y un terminador de la transcripción Rho independiente. El gen *cat* aislado, se ligó al plásmido pUCFUR previamente digerido en el único sitio *EcoRV*, ubicado dentro del gen *fur*. El plásmido pUCFUR* se purificó mediante lisis alcalina de las colonias transformantes con el kit comercial "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System".

La cepa mutante knock-out en el gen *fur*, se obtuvo incubando la cepa *H. pylori* 43504 con el plásmido pUCFUR* durante 24 h en condiciones microaerofílicas, para permitir el intercambio alélico. Las colonias recombinantes se seleccionaron luego sobre placas de agar-sangre suplementadas con cloramfenicol. Una vez amplificadas, se

extrajo el DNA cromosomal de las bacterias y el análisis mediante PCR con los partidores FUR1 y FUR4 confirmó el reemplazo del gen *fur* original por el gen interrumpido (Fig. 3). Los clones seleccionados fueron aquellos en los cuales sólo se obtuvo una banda de 2.670 pb, correspondiente a la suma de los tamaños del gen *fur* más el inserto correspondiente al gen de resistencia a cloramfenicol creándose la cepa *H. pylori* FUR504.

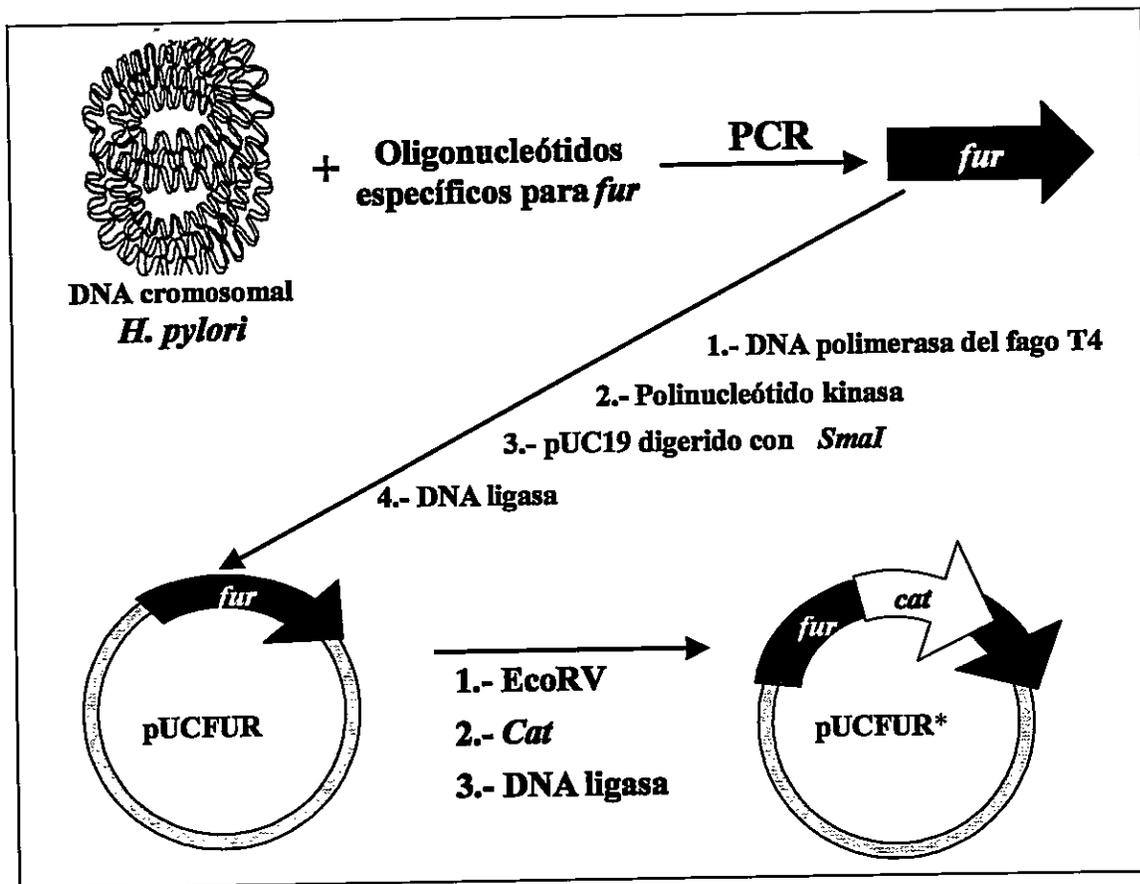


Figura 2. Estrategia general de clonamiento. Metodología básica utilizada para el clonamiento e interrupción del gen *fur* de *H. pylori* ATCC43504.

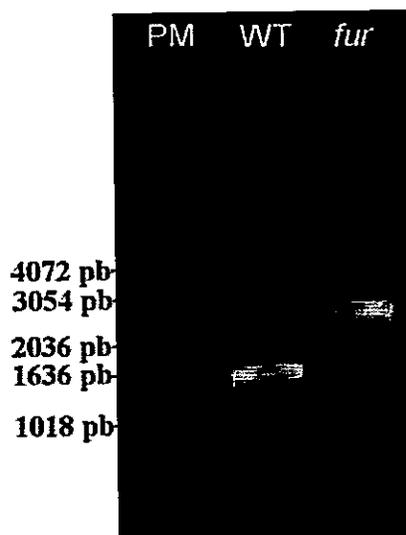


Figura 3. Análisis mediante PCR del gen *fur* mutagenizado. La figura muestra un gel de agarosa en el que la primera línea corresponde al estándar de peso molecular (Marcador 1 kb de Gibco BRL). *wt* corresponde a la amplificación del gen *fur* desde DNA cromosomal de la cepa parental (1500 pb) y *fur* corresponde a la amplificación del gen interrumpido en la cepa isogénica *fur* negativa (2.670 pb).

5.3 Inducción de la respuesta de tolerancia al ácido en *H. pylori*

Para inducir la respuesta de tolerancia al ácido en *H. pylori*, una suspensión de 3×10^8 ufc/ml de bacterias se incubó a pH 6,0 en medio RPMI1640 durante 0, 15, 30, 45 o 60 min a 37°C. Luego de cada tiempo se estudió la resistencia al ácido incubando las bacterias por 30 minutos a pH 4,0. El número de células viables se determinó según el método de Foster y Hall (1991). La respuesta máxima de tolerancia al ácido se alcanzó a los 15 min de adaptación a pH 6,0. Este resultado indica que *H. pylori* desarrolla una respuesta de tolerancia al ácido (Figura 4).

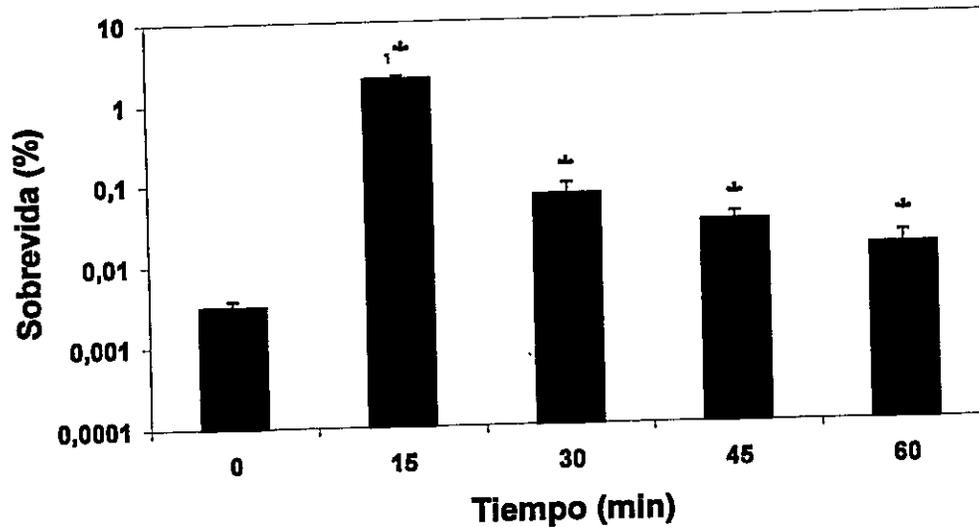


Figura 4: Respuesta de tolerancia al ácido en *H. pylori*. Las células se crecieron hasta la mitad de la fase exponencial y se resuspendieron en amortiguador fosfato-salino o medio RPMI1640 ajustados a pH 6,0 con HCl durante 0, 15, 30, 45 o 60 min. Después de cada tiempo de incubación a pH 6,0 el pH se ajustó a 4,0 con HCl. En la abscisa, se indica el tiempo de adaptación en min, y en el eje de las ordenadas, el porcentaje de supervivencia durante el estrés de pH ácido, expresado en escala logarítmica de acuerdo al método de Foster y Hall (1991). Los resultados muestran el porcentaje promedio de supervivencia de al menos tres experimentos y sus respectivas desviaciones estándar. El asterisco sobre las barras indica diferencias significativas con respecto a las células sin adaptar ($p < 0,05$).

5.4 Crecimiento de *H. pylori* 43504 y de su mutante isogénica FUR504 en medio de cultivo líquido.

El efecto de la mutación del gen *fur* sobre el crecimiento de *H. pylori* se determinó en caldo Brucella a pH 7,0 ó 5,7, suplementado con 5% de suero de caballo. No se observaron diferencias significativas entre el crecimiento de las cepas de *H. pylori* 43504 y FUR504 a pH 7,0 (Figura 5). El crecimiento de ambas cepas mostró un retardo en las primeras 24 h de incubación, luego de lo cual se alcanzó el estado estacionario a las 48 h. Luego de este tiempo se observó una rápida pérdida de la viabilidad de las células tal como se ha descrito en la literatura. El tiempo de generación calculado fue de aproximadamente 3 h para ambas cepas.

Las tasas de crecimiento de la cepa parental y la mutante *fur* mostraron diferencias significativas cuando el experimento se realizó a pH 5,7, siendo el crecimiento de la cepa FUR504 inhibido en estas condiciones de acidez, mientras que la cepa parental mostró un crecimiento significativamente mayor, cuando fue crecida a pH 5,7. (Figura 5) que el observado a pH 7,0.

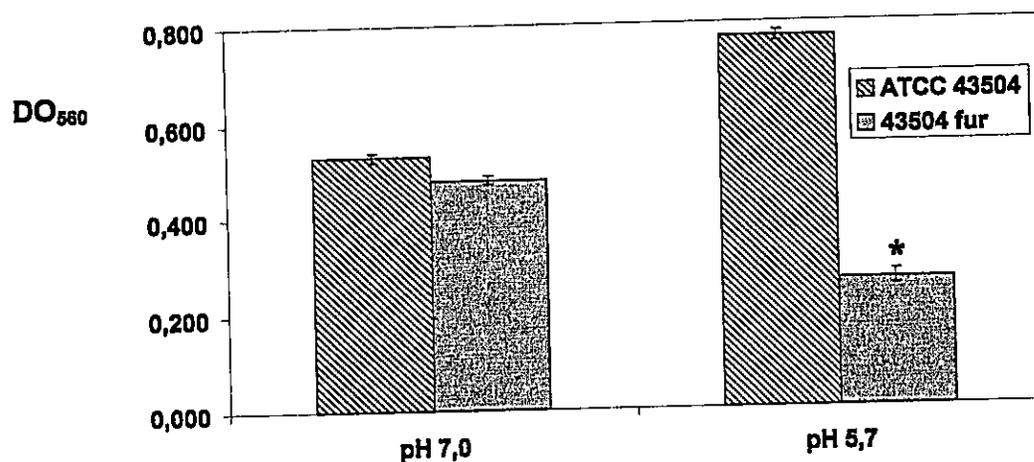


Figura 5. Crecimiento de *H. pylori* en medio líquido. Las barras representan el valor de DO₅₆₀ alcanzado por los cultivos de las cepas 43504 y FUR504 a pH 7,0 o pH 5,7. La densidad inicial para todos los cultivos fue de 0,015 unidades/ml. Las barras con textura indican el crecimiento de la cepa 43504 en ambas condiciones de acidez y las barras con fondo gris indican el crecimiento de la cepa FUR504. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes y sus respectivas desviaciones estándar. El asterisco indica diferencias significativas con respecto a la cepa 43504 en iguales condiciones ($p < 0,05$).

Luego de 48 h de crecimiento, la cepa parental elevó el pH inicial del medio de 5,7 a 7,0. Mientras que el pH del medio subió a 6,0 durante el crecimiento de la cepa mutante. No se observó variación del pH en el medio sin inocular durante el curso del experimento. Los resultados muestran que Fur tiene una función importante en la mantención de la homeostasis de pH en la célula lo que le permite tolerar el pH ácido y crecer en las condiciones experimentales descritas.

5.5 Respuesta de tolerancia al ácido en *H. pylori* FUR504

Para comparar la resistencia al ácido generada como respuesta a la adaptación a pH 6,0 en la cepa 43504 y la cepa FUR504, se monitoreó y comparó durante 30 min la viabilidad de las células a pH 4,0. Las curvas de viabilidad obtenidas muestran que la cepa 43504 es capaz de desarrollar una respuesta ATR, después de ser adaptada a pH 6,0, la cual no se observa en el control no adaptado (incubado a pH 7,0) tal como se indica en la figura 6. Por otra parte, la mutante FUR504 no fue capaz de desarrollar una respuesta ATR indicando que la proteína Fur es esencial para el desarrollo de esta respuesta. No se observaron diferencias significativas de sobrevivencia durante el estrés ácido entre las cepas 43504 y FUR504 sin adaptar (pH 7,0).

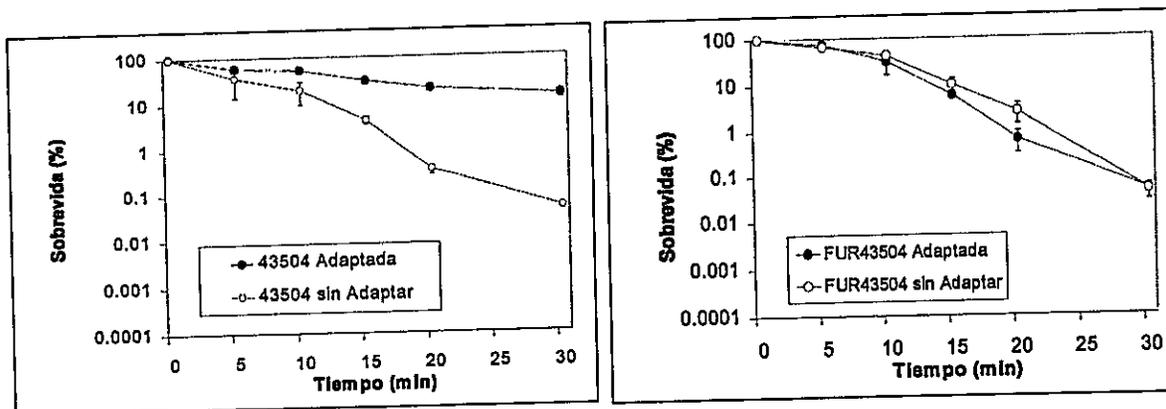


Figura 6. Respuesta de tolerancia al ácido de las cepas *H. pylori* 43504 (A) y FUR504 (B). Las células se adaptaron a pH 6,0 o pH 7,0 durante 30 min y luego se expusieron a pH 4,0 por 30 min. El eje y indica la fracción de colonias viables expresadas como porcentaje, luego de la exposición a pH 4,0. Los datos representan los promedios de al menos tres determinaciones independientes y sus D.E.

5.6 Síntesis de proteínas durante la adaptación a pH 6,0

Con el propósito de averiguar si la respuesta de tolerancia al ácido induce la síntesis de proteínas, el protocolo de adaptación de las células a pH 6,0 se desarrolló en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas. Para ello se adicionó cloramfenicol (20 $\mu\text{g/ml}$) en el medio de incubación durante la etapa de adaptación de *H. pylori* 43504 y se mantuvo el antibiótico durante el estrés ácido. Esta concentración de cloramfenicol fue suficiente para alcanzar una inhibición en la síntesis de aproximadamente 95%. (Resultado no mostrado). Tal como se muestra en la figura 6A, después de 30 min de incubación a pH 4,0, el cultivo adaptado en presencia de cloramfenicol tuvo una menor sobrevivida que el cultivo adaptado en ausencia del antibiótico (Figura 6A). El resultado sugiere que para que se produzca el efecto protector de la etapa de adaptación al pH levemente ácido, debe producirse la síntesis de algunas proteínas claves que son responsables de la sobrevivida de las bacterias durante el estrés de pH ácido.

La presencia del cloramfenicol durante una hora en el medio de incubación, no tuvo efecto negativo sobre la viabilidad de las células. El número de células viables provenientes de la incubación en presencia del antibiótico fue igual al número de células recuperadas de la incubación realizada en ausencia de cloramfenicol.

5.7 Análisis del patrón de proteínas expresadas durante la adaptación de *H. pylori* 43504 a pH 6,0

Los datos anteriores sugieren que la síntesis de proteínas es importante para desarrollar la respuesta ATR durante la adaptación de *H. pylori* a las condiciones subletales de acidez. Es importante entonces determinar los cambios producidos en el patrón de proteínas en la bacteria que le permiten tolerar y crecer en condiciones de pH ácido.

Una suspensión de células de la cepa 43504 se incubó a pH 6,0 ó 7,0 por 1 h en medio RPMI1640 suplementado con 100 μ Ci de [S^{35}]metionina. Luego, las células sonicadas se sometieron a electroforesis bidimensional del tipo NEPHGE en geles de poliacrilamida para analizar el patrón de proteínas expresadas en las células adaptadas y no adaptadas a pH 6,0. Posteriormente los geles deshidratados se expusieron durante 5 días a una pantalla K, de la cual se puede obtener una imagen digitalizada cuando ésta es analizada en un equipo "Personal Molecular Imager FX", mediante el programa "Quantity One" de BioRad.

La figura 7 muestra la imagen digitalizada obtenida y se observa que al menos 51 proteínas modificaron su nivel de expresión en las bacterias adaptadas a pH 6,0 (B) al comparar con el patrón de proteínas obtenido de las células no adaptadas (A). De éstas, 29 mostraron un aumento en su nivel de expresión (flechas azules), mientras que 22 disminuyeron su expresión (flechas rojas).

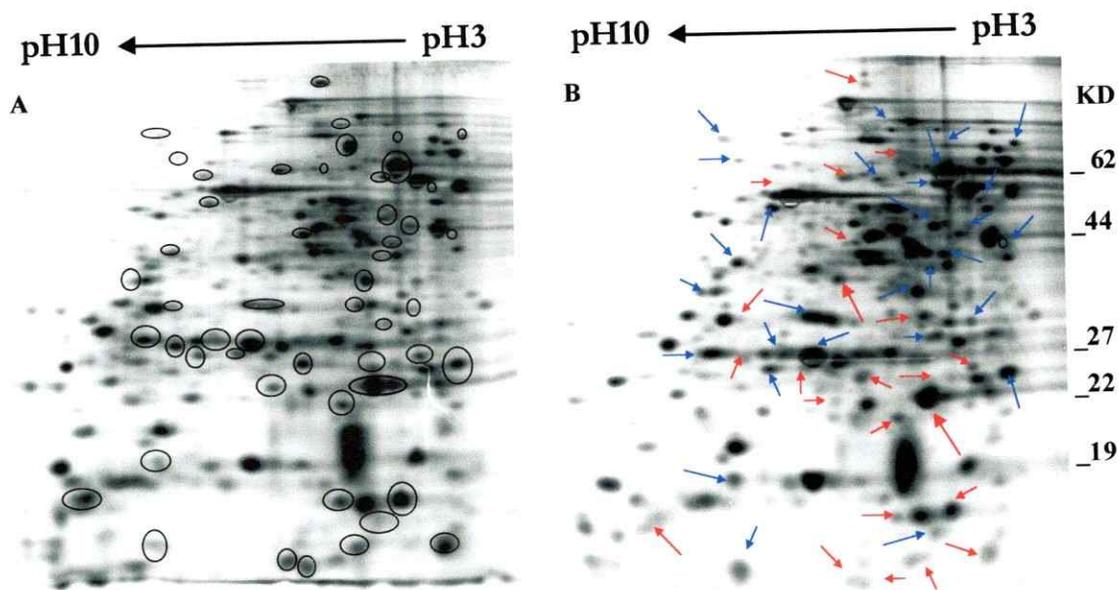


Figura 7. Análisis de la expresión de proteínas durante la respuesta ATR en *H. pylori* mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida del tipo NEPHGE. Una suspensión de 3×10^8 células/ml de *H. pylori* 43504 se incubó en el medio RPMI1640 suplementado con $100 \mu\text{Ci/ml}$ de $[\text{S}^{35}]$ metionina durante 1 h a 37°C a pH 7,0 (A) o pH 6,0 (B). Las flechas rojas indican proteínas cuya expresión está disminuida a pH 6, mientras que las flechas azules indican proteínas que están aumentadas a pH 6,0. Las elipses en A encierran todas las proteínas que se indican con flechas en B. A la derecha de la figura se indica la movilidad de los marcadores de pesos molecular, en kDa. La escala horizontal superior indica la escala de pH. Los geles mostrados para cada condición son los más representativos entre al menos cuatro experimentos independientes.

5.8 Patrón electroforético de las proteínas de *H. pylori* 43504 y FUR504 mediante electroforesis bidimensional

Con el propósito de identificar el efecto de la mutación del gen *fur* sobre la síntesis de las proteínas en la cepa FUR504, se analizó el patrón electroforético bidimensional de las cepas 43504 y FUR504. Para ello las bacterias se incubaron primero en presencia de [S^{35}]metionina a pH 7,0, tal como se describió anteriormente. Los geles 2D se analizaron en triplicado para poder determinar cambios consistentes en el patrón de proteínas y los más representativos de ambas cepas se presentan en la Figura 8. La comparación del patrón de proteínas de ambas cepas indicó que al menos diez proteínas presentaron un incremento significativo producto de la inactivación de *fur* y seis proteínas disminuyeron ($p < 0,05$). Este resultado señaló que Fur estaría actuando directa o indirectamente como regulador positivo y/o negativo en la expresión de estos genes.

De entre las proteínas que aumentaron su expresión en la cepa mutante FUR504 se identificó las proteínas Pfr (ferritina), NapA (proteína activante de neutrófilos) y TsaA (alquilo hidroperóxido reductasa). La asignación de identidad para estas proteínas se realizó de acuerdo a sus coordenadas de migración en los geles bidimensionales y mediante la comparación de estos parámetros con los que se obtienen de geles bidimensionales disponibles en la literatura (Kim y col. 2002, McAtee y col. 1998, Slonczewskij y col. 2000, Jungblut y col. 2000).

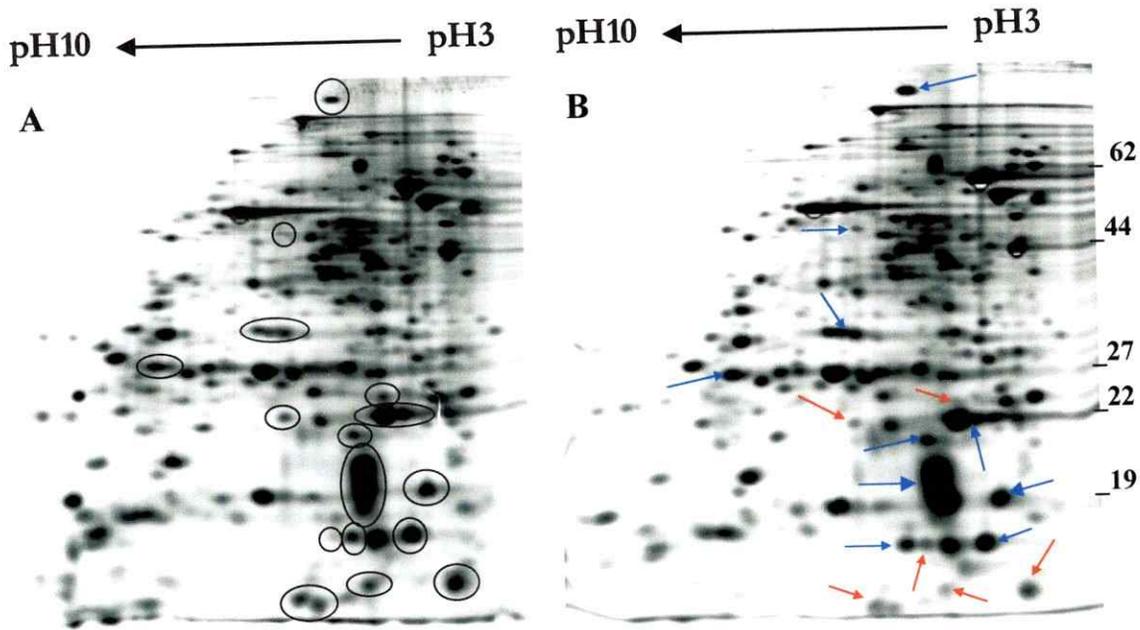


Figura 8. Análisis 2D PAGE del patrón de proteínas de *H. pylori* 43504 y FUR504. En A se muestra el patrón electroforético de la cepa 43504 y en B el de la cepa FUR504. Las células se incubaron tal como se señala en la figura 7 durante 1 h a pH7,2. Las proteínas que muestran diferencias cuantitativas ($p < 0.05$) entre las dos cepas se indican en cuadrados. La flecha azules indican las proteínas que aumentaron su expresión y las rojas, las que disminuyen.

5.9 Análisis del patrón electroforético de la cepa FUR504 de *H.pylori* durante la adaptación a pH 6,0

Mediante electroforesis bidimensional se analizó el patrón de proteínas expresado por el mutante *fur* adaptado a pH 6,0, tal como se describe en el experimento desarrollado en la cepa 43504. En la figura 9B se muestra el patrón electroforético obtenido cuando la cepa 43504 es adaptada a pH 6,0 y en A, el patrón proteico de la cepa FUR504. El análisis comparativo de los geles muestra que en la cepa FUR504 hay 15 proteínas cuya expresión se observó alterada respecto del patrón de proteínas de la cepa 43504. De este grupo, 6 aumentaron su expresión por la falta del regulador Fur, contrariamente a lo que se observa

en la cepa parental que disminuyen su expresión por efecto de la adaptación a pH 6,0. Entre estas proteínas están NapA, Pfr y TsaA, identificadas por sus coordenadas de migración y mediante la comparación con geles bidimensionales disponibles en la literatura, como ya se mencionó. Por otra parte, en círculos se indican 7 proteínas que pierden la capacidad de ser inducidas y que en la cepa parental aumentan su expresión por efecto del pH ácido. Este resultado sugiere que la pérdida de la respuesta ATR en la cepa FUR504 se podría deber en parte a la falta de regulación de este grupo de proteínas y en particular de aquellas que no se indujeron.

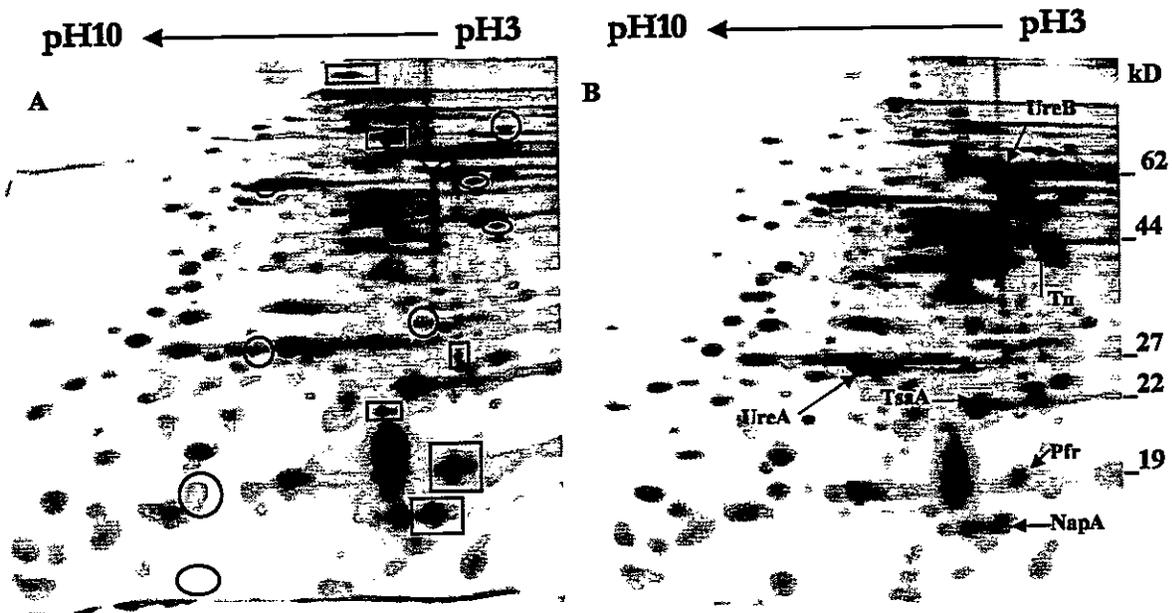


Figura 9. Patrón electroforético de las proteínas expresadas durante la adaptación a pH 6,0 en las cepas 43504 y FUR504. **A** Patrón proteico de la cepa mutante. En círculos se indican las proteínas que no son inducidas y en rectángulos las que no son reprimidas durante la respuesta ATR. **B.** Patrón de proteínas obtenido de la cepa parental en las mismas condiciones. En este gel se señalan las proteínas identificadas mediante sus coordenadas de migración.

5.10 Adaptación a ácidos orgánicos y respuesta ATR

En el intestino humano hay una alta concentración de ácidos orgánicos productos de la fermentación de la flora bacteriana (Cummings y col., 1987) que puede inducir una respuesta ATR en las diferentes bacterias que se encuentran en este medio. Dado que *H. pylori* es el causante de la úlcera duodenal, es lícito pensar que la bacteria puede estar sujeta a un estrés de pH ácido por la presencia de estos ácidos orgánicos e inducir una respuesta ATR tal como lo muestran los estudios realizados en *E. coli* y *S. typhimurium* (Kwon y col., 1998; Arnold y col., 2001). Por lo tanto, el siguiente objetivo fue estudiar si los ácidos orgánicos de cadena corta pueden desarrollar en *H. pylori* una respuesta ATR similar a la observada en *E. coli* y *S. typhimurium* (Arnold y col., 2001; Kwon y col., 1998). Con ese propósito, *H. pylori* 43504 se incubó en presencia de 100 mM de ácidos acético, propiónico o butírico, a pH 7,0 durante 1 h. Luego de este período de incubación las células se centrifugaron y se lavaron con amortiguador fosfato salino, para retirar el ácido orgánico. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio RPMI1640 ajustado a pH 3,0 con HCl, para provocar un estrés ácido, durante 25 min. Como control del experimento se usó una solución de NaCl 100 mM, pH 7,0 debido a que se utilizó NaOH (1,0 M, pH 7,0) para ajustar el pH final de las soluciones de ácidos orgánicos y además, descartar un posible efecto de shock osmótico. El porcentaje de sobrevivencia de la bacteria se calculó determinando el número de bacterias recuperadas después del estrés a pH 3,0 en relación con el número de bacterias obtenidas después de la incubación en presencia del ácido orgánico, según el método de Foster y Hall (1991).

La respuesta ATR desarrollada por los ácidos acético y propiónico, fue significativamente mayor que la inducida por ácido butírico o por NaCl, pero menor a la obtenida cuando las células se trataron con HCl, siendo la viabilidad de 0,35% después de la exposición a ácido propiónico, de 0,11% después de la adaptación con ácido acético y un 0,045% luego de la exposición a ácido butírico, mientras que con NaCl sólo se alcanzó un 0,023%. La adaptación a ácido propiónico desarrolló la mayor tolerancia al ácido (Figura 10). Con el propósito de ver si había alguna diferencia en el crecimiento de las bacterias después del tratamiento con los ácidos orgánicos, que explique las diferencias observadas por la respuesta ATR, se lavaron las células y se siguió el crecimiento de ellas en medio RPMI1640 ajustado a pH 7,0. No se observó diferencias en el crecimiento de las cepas tratadas con los ácidos orgánicos versus las no tratadas, por lo que se descarta que la mayor tolerancia al ácido, luego del tratamiento, se deba a un aumento en el crecimiento de las bacterias (resultados no mostrados). Los resultados indican que la exposición a los ácidos orgánicos inducen una respuesta ATR en *H. pylori* y que este nivel de respuesta depende del tipo de ácido orgánico, con el cual se produce la adaptación. Además, el control realizado con NaCl indica que esta respuesta no se relaciona con un posible estrés osmótico debido a la alta concentración de ácidos o de las sales presentes.

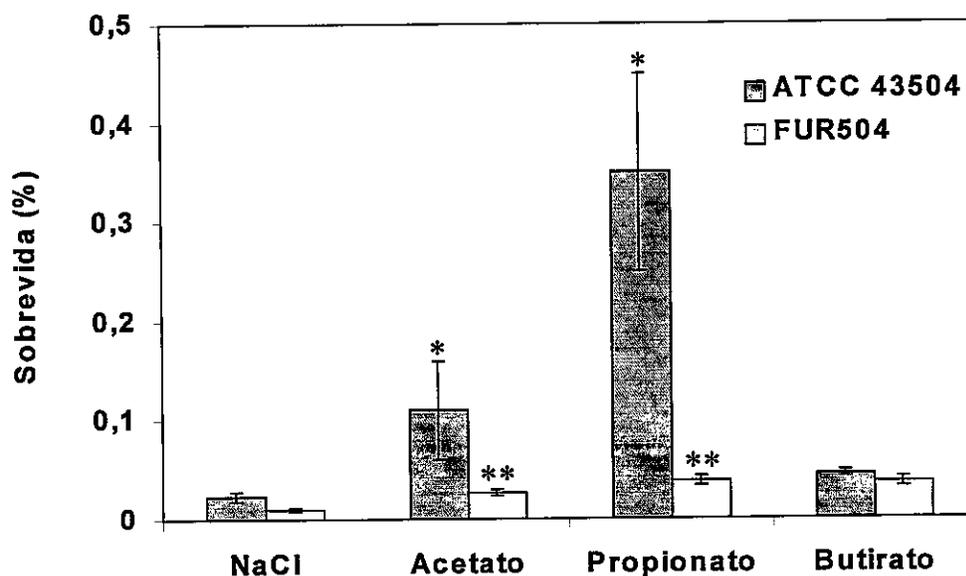


Figura 10. Respuesta de tolerancia al ácido de *H. pylori* 43504 y FUR504 inducida por ácidos orgánicos. *H. pylori* se incubó con ácido acético, propiónico o butírico 100 mM, ajustado a pH 7,0, por una hora, para inducir la respuesta ATR. Luego de lavadas con PBS, las células se sometieron a un estrés de pH ácido (pH 3,0). Las barras representan el promedio de al menos tres experimentos independientes y sus respectivas desviaciones estándar. El * indica diferencias estadísticamente significativas en relación con el control tratado con NaCl 100 mM. Los ** indican diferencias estadísticamente significativas entre la cepa mutante y la cepa parental ($p < 0,05$).

El siguiente objetivo fue determinar si Fur tiene alguna función en la respuesta de tolerancia al ácido inducida por los ácidos orgánicos. Para ello, la cepa de *H. pylori* FUR504 se incubó en las condiciones descritas en presencia de los ácidos orgánicos, ya señalados, durante una hora y luego se sometieron a un estrés de pH 3,0 durante 25 min. Los resultados muestran que luego de adaptar las células a pH 7,0 en presencia de ácido acético, propiónico o butírico la sobrevivida a pH 3,0 fue de 0,027 %, 0,038% y 0,037% respectivamente (Figura10). Mientras que el control en presencia de NaCl 100 mM y ausencia de ácido orgánico fue de 0,01%. Este resultado indica que la cepa FUR504 no es capaz de desarrollar esta respuesta ATR sugiriendo que el regulador transcripcional Fur

también modula el mecanismo de la respuesta ATR cuando las células son expuestas a ácidos orgánicos de cadena corta.

5.11 Efecto de los ácidos orgánicos sobre la síntesis de proteínas en *H. pylori*

La exposición del microorganismo a ácido acético o propiónico induce una respuesta de tolerancia al ácido y esta es modulada por Fur. En la figura 11, se muestra el perfil electroforético, mediante electroforesis bidimensional al no-equilibrio, de las proteínas de *H. pylori* 43504 incubadas a pH 7,0 durante una hora en presencia de ácido acético (A) o ácido propiónico (Figura 11B). En cambio en C se observa el perfil electroforético de las proteínas de las células incubadas con ácido butírico obtenido mediante la técnica electroforética de O' Farrell (1972).

El análisis cuantitativo de los geles mostró una disminución en la cantidad de [³⁵S]metionina incorporada a las proteínas durante el tratamiento con los ácidos orgánicos en relación con la incorporación del aminoácido cuando las células se trataron con HCl. El tratamiento de las células con ácido acético resultó en un 12% de incorporación del aminoácido respecto de la incorporación obtenida en el control en ausencia de ácidos orgánicos. Mientras que el tratamiento con los ácidos butírico y propiónico resultó en un 34% y un 24% de incorporación del aminoácido respectivamente. Como ya se mencionó, la adaptación de las células con ácidos orgánicos no produce una pérdida significativa de la viabilidad en el tiempo del ensayo que explique esta menor incorporación del aminoácido.

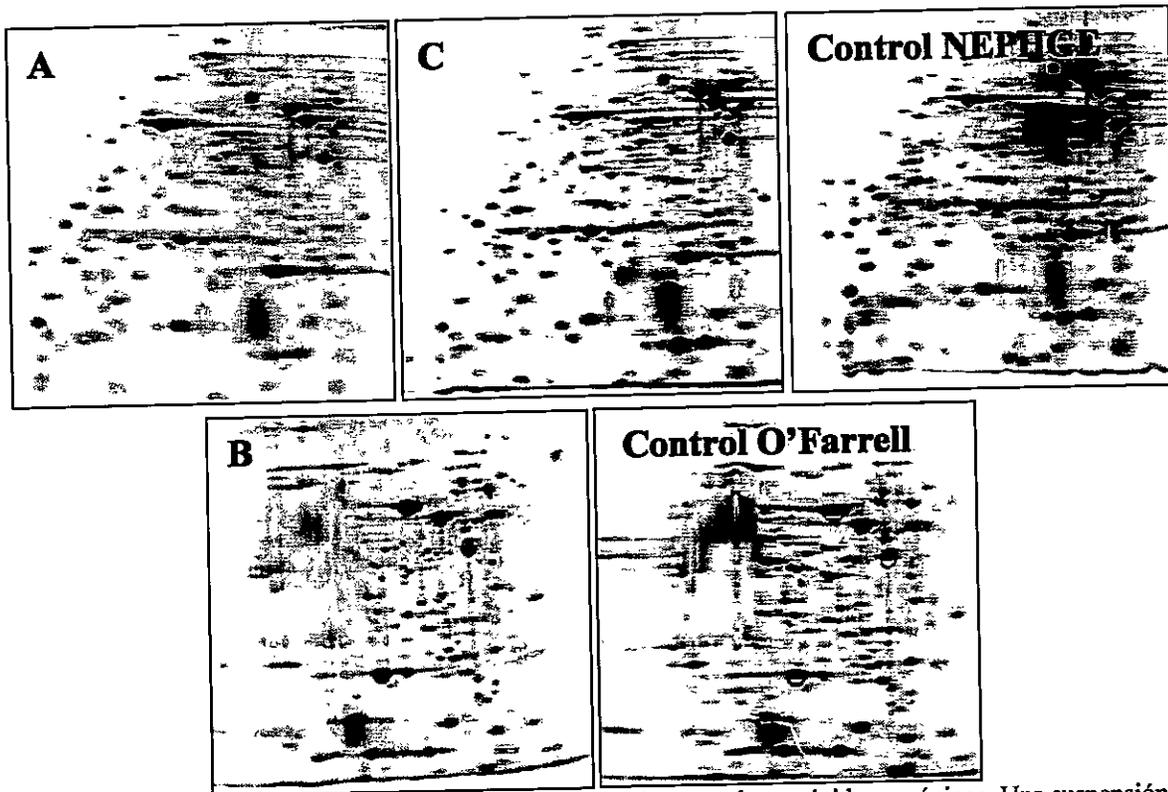


Figura 11. Patrón electroforético de las proteínas de *H. pylori* tratada con ácidos orgánicos. Una suspensión de *H. pylori* 43504 se trató por 1 h con ácidos orgánicos 100 mM, en presencia de [S^{35}]metionina. A: ácido acético, B: ácido propiónico y C: butírico. Los tres geles superiores muestran los perfiles electroforéticos obtenidos utilizando la técnica de NEPHGE y los dos inferiores utilizando la técnica de O' Farrell.

5.12 Análisis de la expresión de proteínas en *H. pylori* después del tratamiento

con ácidos orgánicos

La adaptación de *H. pylori* a pH 7,0 en presencia de ácidos orgánicos provocó una disminución importante de la síntesis de proteínas, tal como se muestra en la figura 11. Sin embargo, al ser sometidas estas células a un estrés de pH ácido ellas desarrollan una respuesta de tolerancia al ácido, que de acuerdo a los experimentos realizados con la cepa FUR504 parece ser dependiente de Fur. Con el propósito de determinar si después del tratamiento con los ácidos orgánicos existe una etapa de recuperación de las células, se incubó *H. pylori* 43504 en presencia de ácido propiónico ajustado a pH 7,0 por una hora. Luego se centrifugaron las células se lavaron con amortiguador fosfato salino y se resuspendieron RPMI1640 ajustado a pH 7,0 suplementado con [S^{35}]metionina, durante 15 min. Las células se analizaron mediante electroforesis bidimensional. Los autorradiogramas muestran que después de retirar el ácido orgánico, del medio de cultivo, se restablece la síntesis de proteínas y ésta es mayor que la que se observó en las células controles, que no fueron tratadas con ácido propiónico (Figura 12). Este resultado indica que la exposición de la bacteria a los ácidos orgánicos produce una disminución de la síntesis de proteínas , que no produce un efecto bactericida sobre la bacteria al menos durante el intervalo de tiempo en el cual se desarrollaron los experimentos.

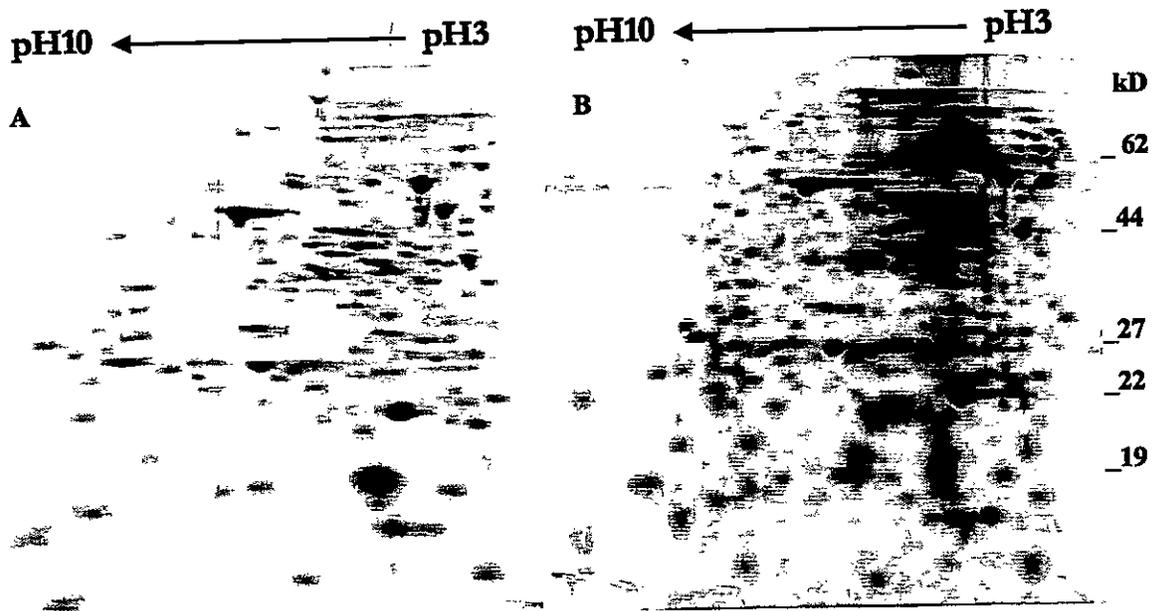


Figura 12. Análisis bidimensional de las proteínas de *H. pylori* 43504 después del tratamiento con ácido propiónico. En A se observa la incorporación de la metionina en una suspensión de *H. pylori* 43504 incubada en medio RPMI1640 a pH 7,0 suplementado con 100 μ Ci de [S^{35}]metionina por 10 minutos y en B, una suspensión de bacterias fue tratada con ácido propiónico 100 mM a pH 7,0 durante 1 h, luego de este tiempo se retiró el ácido lavando las células con PBS y se incubaron por 10 min a pH 7,0 en medio RPMI1640 suplementado con 100 μ Ci de [S^{35}]metionina.

6. DISCUSIÓN

6.1 Respuesta de tolerancia al ácido en *H. pylori*

H. pylori, coloniza la mucosa gástrica donde el pH es aproximadamente entre 4 y 5, razón por la cual se piensa que la bacteria está muy bien adaptada a vivir en condiciones de acidez. Sin embargo, los resultados de este estudio muestran que *H. pylori* es capaz de desarrollar una respuesta de tolerancia al ácido (ATR), durante la exposición a condiciones subletales de pH ácido (pH 6,0) y que este mecanismo es independiente de la presencia de la ureasa, enzima que se reconoce como factor de virulencia y colonización. La respuesta ATR inicialmente se describió en *S. typhimurium* y posteriormente se estudió en *E. coli*. Desde que esta respuesta fue identificada en estas dos enterobacterias, se ha demostrado que una gran cantidad de bacterias Gram negativas y Gram positivas han desarrollado un mecanismo de tolerancia al ácido, que les permite sobrevivir a condiciones más drásticas de acidez.

Karita propuso que *H. pylori* desarrolla la respuesta ATR (Karita y Blaser, 1998) pero sus estudios no analizaron las características de ésta. En *H. pylori* la respuesta ATR parece ser temporal y depende de la síntesis de un grupo de proteínas. Nuestros resultados muestran que la máxima tolerancia al ácido desarrollada por *H. pylori* se alcanza a los 15 min de adaptación a pH 6,0, condición en la cual el número de células recuperadas y que sobreviven a este estrés es mayor aproximadamente en 2 a 3 órdenes de magnitud después de la exposición a pH 4,0 comparado con el número de las células recuperadas no adaptadas (expuestas a pH 7,0). Por otra parte, la respuesta se mantiene al menos una hora durante el proceso de adaptación, aunque la sobrevivencia de las bacterias va disminuyendo a medida que el tiempo de adaptación se hace más prolongado.

Foster en sus estudios de adaptación a pH ácido con *S. typhimurium* también encontró que el máximo de la respuesta se alcanza a los 15 min de adaptación a pH subletal y que ésta va declinando a medida que transcurre el tiempo de adaptación, sugiriendo que la respuesta es temporal (Foster y Hall, 1991). Sin embargo, el carácter transitorio de esta respuesta parecer no ser una característica general en todos los microorganismos estudiados, ya que en el caso de *L. monocytogenes* la adquisición de la tolerancia al ácido se consigue gradualmente durante la etapa de adaptación (Davis y col., 1996).

La respuesta ATR desarrollada por *H. pylori* a pH 6,0 no solo protege a la bacteria del estrés a pH 4,0 sino que también la protege a condiciones más extremas de acidez como pH 3,0 (Toledo y col., 2002). Esto sugiere que la respuesta ATR desarrollada por *H. pylori* es similar a la desarrolla por *S. typhimurium* cuando la bacteria es expuesta a pH 5,8 (Foster, 1991). Es bien conocido que *H. pylori* no puede crecer y sobrevivir *in vitro* a pH 5,0 o menor y que en estas condiciones de acidez la presencia de urea aumenta notablemente la sobrevivencia del microorganismo (Toledo y col., 2002). Recientemente, Toledo y col. (2002) mostraron que *H. pylori* no es capaz de desarrollar respuesta ATR en presencia de urea. Sin embargo, es posible lograr que la bacteria responda a los efectos del pH ácido, desarrollando una respuesta ATR en condiciones en las que el microorganismo no es capaz de utilizar la urea. Esta condición se logró con la cepa de *H. pylori* DW504, mutante para el gen *ureI* que ha sido caracterizado como un canal específico para urea (Weeks y col., 2000). Con esta cepa es posible inducir la respuesta ATR independientemente de la presencia de ureasa (Toledo y col., 2002).

Una característica importante de la respuesta ATR en *H. pylori* es que depende de la síntesis *de novo* de algunas proteínas, como lo demuestran los estudios realizados en

presencia de cloramfenicol, un inhibidor de la síntesis de proteínas, durante la etapa de adaptación. Este resultado es coincidente con los estudios realizados en *S. typhimurium*, *E. coli*, *A. hydrophila*, *Streptococcus faecalis* y *L. monocytogenes*, donde también se ha determinado que la síntesis de proteínas es esencial para que estas bacterias desarrollen la respuesta ATR.

El análisis de las proteínas mediante electroforesis bidimensional después de inducir la respuesta ATR muestra que ésta es compleja, produciéndose la inducción y la represión de la síntesis de un gran número de proteínas (Toledo y col., 2002; Foster, 1991; Davis, 1996). El patrón electroforético de las proteínas de *H. pylori* adaptado a pH 6,0, obtenido mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bidimensionales del tipo NEPHGE, muestra que aproximadamente 51 proteínas se ven afectadas por la presencia del ácido, tal como se ha descrito en otras enterobacterias. De éstas, 29 proteínas aumentan su expresión y 22 la disminuyen. Dentro del grupo de proteínas que aumentan su expresión se identificó a las subunidades UreA y UreB, de la ureasa, por sus coordenadas de migración, dadas por su pI y peso molecular, y por la gran cantidad de estas proteínas que normalmente representan el 15% de la proteína total de la bacteria. Es interesante destacar que nuestro resultado es coincidente con otro estudio que indica que hay un aumento de la transcripción de los genes *ureA* y *ureB* cuando la bacteria se crece en condiciones subletales de acidez (Ang y col., 2001; Allan, 2001). Otra proteína identificada, por sus coordenadas de migración, es la proteína TsaA que disminuye su nivel de expresión, coincidiendo con el resultado de Slonczewski y col. (2000) quienes encontraron que TsaA disminuye su expresión durante el crecimiento de *H. pylori* en medio ácido, pH 5,5. Sin embargo, este resultado es contradictorio con los resultados obtenidos en *E. coli* que muestra un incremento de expresión, en condiciones de pH ácido, de la proteína homóloga,

AhpC, que participa en la reducción de los radicales de oxígeno, (Blankenhorn y col., 1999).

6.2 Función del regulador transcripcional Fur en el desarrollo de la respuesta ATR en

H. pylori

Los estudios de resistencia al ácido en *S. typhimurium* demostraron que el regulador transcripcional Fur tiene una importante función en el desarrollo de la respuesta de tolerancia al ácido (Foster, 1992), además de su función en la regulación de la homeostasis de hierro. Dado que Fur es el único regulador transcripcional presente en el genoma de *H. pylori*, de los descritos que participan en la adaptación al ácido en otras bacterias, es importante estudiar su función en la respuesta de tolerancia al ácido desarrollada por este microorganismo.

Los resultados obtenidos con el mutante isogénico *fur*, FUR504, de la cepa *H. pylori* 43504 creada en este trabajo, indican que a pH 7,2, en medio líquido, no hay diferencia entre la tasa de crecimiento de la cepa FUR504 y la cepa parental. Sin embargo, en condiciones de acidez, el crecimiento de la mutante se encuentra disminuido. Este fenotipo no se debe a la falta de regulación de la homeostasis de hierro, ya que en las condiciones de nuestro ensayo el medio de incubación donde se desarrollan los estudios de pH ácido no contiene una concentración de hierro alta (20 μ M), de modo que la reacción de Fenton, favorecida por las condiciones de acidez a las que se someten las células, no da cuenta de los posibles daños oxidativos producto de los radicales libre que esta reacción puede generar. Esta afirmación está apoyada por los resultados de Bereswill (2000) quien demostró que el crecimiento de mutantes *fur* no es más sensible a las distintas concentraciones de hierro. Sin embargo, cepas mutantes *pfr* negativos sí son afectadas en

su crecimiento cuando se exponen a pH 6,0 en presencia de altas concentraciones de hierro (Waidner, 2002). Esto porque Pfr almacena el hierro protegiendo a la bacteria de la toxicidad del ion Fe^{2+} (Bereswill y col., 2000).

En *Staphylococcus aureus*, la expresión de KatA, enzima encargada de la desintoxicación de radicales libres de oxígeno, se regula positivamente por Fur. En este caso las mutantes *fur* son sensibles al ácido debido al aumento del estrés oxidativo en condiciones de acidez, incluso en un medio no suplementado con hierro (Horsburgh y col., 2001). En *H. pylori*, los genes que participan en la desintoxicación de estos radicales libres de oxígeno (*tsaA* y *kata*) no presentan regulación por Fur mediado por la concentración de hierro (Delany y col., 2001). Por esto no es posible explicar, en parte, el fenotipo sensible al ácido en la cepa FUR504, por falta de regulación de estos genes debido a la ausencia del regulador Fur en esta mutante. Esto sugiere que la disminución del crecimiento a pH 5,7 de la mutante *fur* no se debería a un aumento en la sensibilidad al estrés oxidativo producto de las condiciones de acidez y que el gen *fur* está directamente implicado en la regulación de la respuesta de tolerancia al ácido tal como fue descrito para *S. typhimurium* (Foster y Hall, 1990; Foster, 1992).

Los resultados de este trabajo señalan que la ausencia de Fur en *H. pylori* también provoca la pérdida de la respuesta ATR. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia en el comportamiento frente al estrés ácido entre la cepa parental y la mutante cuando ambas se adaptaron a pH 7,0, sugiriendo que la mutación de *fur* no afecta la capacidad de *H. pylori* para sobrevivir al estrés ácido, pero sí afecta el fenotipo de adaptación al pH subletal.

Sabemos que la proteína UreI, el canal de urea, es abierto por protones y que esto ocurre cuando el pH es igual o menor a 5,5 (Weeks y col., 2000). Por otra parte, en

condiciones fisiológicas la concentración de urea en el estómago es entre 3 y 10 mM. En estas condiciones, *ex vivo*, la síntesis de proteínas y el crecimiento de la bacteria no se afecta cuando las células son expuestas a un estrés de pH ácido (Toledo y col., 2002; Stingl, 2001). Nuestros resultados señalan que en presencia de urea *H. pylori* responde al estrés de pH ácido <5,5 utilizando la urea y en condiciones en que el pH es superior a 5,5 la bacteria desarrolla una respuesta ATR que le permite adaptarse a las condiciones de acidez, dado que UreI a este pH se encuentra cerrado a la urea.

El análisis del patrón electroforético de las proteínas sintetizadas por la cepa mutante *fur*, comparado con el patrón electroforético obtenido de la cepa parental, muestra que un grupo de proteínas pierde su regulación cuando la bacteria se encuentra en condiciones de pH 7,0 producto de la ausencia de Fur. Entre ellas se encuentran dos proteínas que están involucradas en la homeostasis de hierro y que son reguladas negativamente por Fur de manera dependiente de hierro, Pfr y NapA, (van Vliet y col., 2002). Ambas proteínas también son moduladas por las condiciones de acidez del medio, sugiriendo que el regulador Fur lo hace de manera dependiente de la concentración de protones. Este resultado sugiere que el regulador Fur de *H. pylori*, al igual que el de *S. typhimurium*, posee dominios diferentes que permiten a la proteína responder frente a los cambios de la concentración de protones o a la concentración de hierro, dirigiendo la proteína al blanco adecuado para adaptar a la bacteria al estímulo del medio.

El análisis global de los geles bidimensionales obtenidos de las cepas de *H. pylori* 43504 y su mutante FUR504 a pH 7,0 y pH 6,0 permite identificar dos poblaciones de proteínas que poseen un comportamiento diferente frente a la adaptación al pH ácido. De él se desprende que 29 proteínas se inducen y 22 se reprimen durante el desarrollo de la respuesta ATR. Entre las proteínas inducidas 7 de ellas están bajo el control de Fur

mientras que entre las que se reprimen solo se identificaron 6 que están bajo el control del regulador Fur (Figura 13).

Este análisis sugiere que Fur actúa regulando un grupo importante de proteínas de manera dependiente de la concentración de protones, interaccionando sobre elementos reguladores de los genes blancos, cajas Fur, o mediante un efecto de cascada a través de otros reguladores intermediarios que podrían estar participando en el desarrollo de la respuesta ATR, o una combinación de ambos mecanismos de regulación. En síntesis, Fur puede actuar como un regulador positivo y/o negativo de la expresión de las proteínas que aumentan y disminuyen durante la respuesta ATR (Figura 13).

Los resultados señalan que el fenotipo sensible al ácido es producto de la mutación knock-out producida en el gen *fur* y que ésta bloquea la respuesta ATR, indicando que Fur está implicado en la mantención de la homeostasis de pH. Es importante desarrollar estudios adicionales que permitan caracterizar mejor esta respuesta de adaptación al ácido identificando las proteínas implicadas en este mecanismo como la función de cada una de ellas en *H. pylori*.

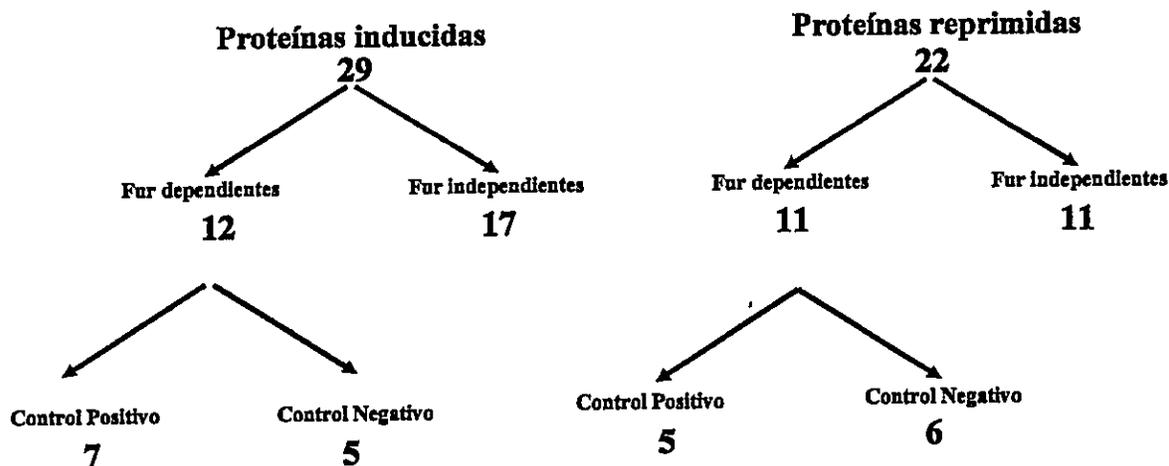


Figura 13. Representación esquemática de las proteínas reguladas por ácido en *H. pylori*

6.3 Respuesta de adaptación de *H. pylori* a la presencia de ácidos orgánicos

La exposición de cultivos en fase exponencial de *E. coli* (Arnold y col., 2001) y *S. typhimurium* (Kwon y col., 1998) a ácidos orgánicos de cadena corta tales como acético, propiónico y butírico, a pH neutro, incrementan la capacidad de las bacterias para tolerar condiciones de acidez. Esta respuesta inducida de tolerancia al ácido mediante la adición de ácidos orgánicos de cadena corta requiere de la síntesis de proteínas (Arnold y col., 2001; Kwon y col., 1998). *In vitro*, los ácidos orgánicos de cadena corta pueden tener un efecto bacteriostático o bactericida dependiendo de su concentración, y/o pH (Cherrington y col., 1991). En este estudio se analizó si en *H. pylori* también se desarrolla la respuesta de tolerancia al ácido orgánico. Los resultados muestran que luego de tratar las células por una hora con ácido propiónico o acético 100 mM se aumenta significativamente la tolerancia al ácido de la bacteria, en relación con las células sin tratar con ácido orgánico Sin embargo, este incremento es menor que el observado cuando se obtiene la respuesta de

tolerancia máxima con las células tratadas con ácido inorgánico (HCl). Esta respuesta de tolerancia al ácido inducida por los ácidos orgánicos parece ser también regulada por Fur ya que la cepa FUR504 no desarrolla esta respuesta, tal como se observó con cepas mutantes *fur* de *S. typhimurium* (Kwon y Ricke, 1998).

El patrón electroforético de las proteínas de las células tratadas con los ácidos orgánicos muestra una inhibición global de la síntesis de proteínas, esto se debe a un efecto bacteriostático que no afecta la viabilidad de las células durante las primeras seis horas de tratamiento. La recuperación del número de células y el aumento de la incorporación de la metionina en las proteínas de las células tratadas durante una hora con ácido orgánico y posterior eliminación de él confirman el efecto bacteriostático que se produce por el tratamiento con los ácidos orgánicos de cadena corta en *H. pylori*, que al igual que en *E. coli* podría deberse a una inhibición de algunos genes que participan en la transcripción (Arnold, 2001).

La disminución de la síntesis de proteínas observada en *H. pylori* producto de la presencia de ácidos orgánicos contrasta con lo observado en *E. coli* y *S. typhimurium* donde se obtiene, al igual que con el tratamiento con HCl, un incremento y disminución de la traducción de un gran número de proteínas. Es posible pensar que al retirar el estímulo provocado por los ácidos orgánicos, en *H. pylori*, se desarrolle una respuesta que llamamos post-estrés que de cuenta de la resistencia al ácido observada en esta bacteria.

7. CONCLUSIONES

- 1 *H. pylori* desarrolla la respuesta de tolerancia al ácido transiente cuando se encuentra en condiciones de pH subletal.
- 2 La respuesta de tolerancia al ácido modula la expresión de un grupo importante de proteínas que deben estar implicadas en la regulación de la homeostasis de pH.
- 3 El regulador transcripcional Fur está implicado en la respuesta ATR y en el crecimiento de la bacteria en condiciones subletales de acidez posiblemente regulando la expresión de los genes afectados por la concentración de protones.
- 4 Los ácidos orgánicos de cadena corta poseen un efecto bacteriostático y además, inducen una respuesta ATR menor que la observada en respuesta al HCl.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Allan E., Clayton C., McLaren A., Wallace D. y Wren B. 2001. Characterization of the low-pH responses of *Helicobacter pylori* using genomic DNA arrays. *Microbiology*. 147: 2285- 2292.
- Alm R., Ling L., Moir D., King B., Brown E., Doig P., Smith D., Noonan B., Guild B., deJonge B., Carmel G., Tummino P., Caruso A., Uria-Nickelsen M., Mills D., Ives C., Gibson R., Merberg D., Mills S., Jiang Q., Taylor D., Vovis G. y Trust T. 1999. Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 397: 176- 180.
- Ang S., Lee C., Peck K., Sindici M., Matrubutham U., Gleeson M., y Wang J. 2001. Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: study in genomic scale by microarray. *Infect. Immun.* 69: 1679- 1686.
- Arnold C., McElhanon J., Lee A., Leonhart R. y Siegele D. 2001. Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *J. Bacteriol.* 183: 2178- 2186.
- Bearson S., Bearson B. y Foster J. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 147: 173- 180.
- Bereswill S., Greiner S., van Vliet A., Waidner B., Fassbinder F., Schiltz E., Kusters J. y Kist M. 2000. Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 182: 5948- 5953.
- Bergsson G., Steingrimsson O. y Thormar H. 2002. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents.* 20: 258-262
- Bijlsma J., Gerrits M., Imamdi R., Vandenbroucke- Grauls C. y Kusters J. Urease-positive, acid-sensitive mutants of *Helicobacter pylori*: urease- independent acid resistance involved in growth at low pH. 1998. *FEMS Microbiol. Lett.* 167: 309-313.
- Bukau, B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat- shock response. *Mol. Microbiol.* 9: 671- 80.
- Clyne M., Labigne A. y Drumm B. 1995. *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect. Immun.* 63: 1669- 1673.
- Cover T. y Blaser M. 1996. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implication for eradication and prevention. *Adv. Intern. Med.* 41: 85- 117.

Coy M. y Neilands J. 1991. Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry*. 30: 8201-8210.

Cuff J., Clamp M., Siddiqui A., Finlay M. y Barton G. 1998. J-Pred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics*. 14: 892-893.

Cummings J., Pomare E., Branch W., Naylor C. y MacFarlane G. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. 28: 1221- 1227.

Davis M., Coote P. y O'Byrne C. 1996. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology*. 142: 2975- 2982.

Delany I., Pacheco A., Spohn G., Rappuoli R. y Scarlato V. 2001. Iron-dependent transcription of the *frpB* Gene of *Helicobacter pylori* is controlled by the Fur Repressor Protein. *J. Bacteriol*. 183: 4932-4937.B

Delany I., Spohn G., Pacheco A., Ieva R., Alaimo C., Rappuoli R. Y Scarlato V. 2002. Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Mol. Microbiol*. 46: 1107-1122.

Drasar B., Shiner M. y McLeod G. 1969. Studies on the intestinal flora. The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. *Gastroenterology*. 56: 71-79.

Doig P., de Jonge, B., Alm, R., Brown, E., Uria-Nickelsen, M., Noonan, B., Mills, S., Tummino, P., Carmel, G., Guild, B., Moir, D., Vovis, G. y Trust, T. 1999. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 63: 675- 707.

Donahue J., Israel D., Peek R., Blaser M. y Miller G. 2000. Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol*. 37: 1- 10.

Dunn B., Perez- Perez G. y Blaser M. 1989. Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of *Campylobacter pylori* proteins. *Infect. Immun*. 57: 1825- 1833.

Dunn B., Campbell G., Perez- Perez G. y Blaser M. 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem*. 265: 9464- 9469.

Dunn B., Cohen H. y Blaser M. 1997a. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiol. Rev*. 10: 720- 741.

Dunn, B., Vakil N., Schneider B., Miller M., Zitzer J., Peutz T. y Phadnis S. 1997b. Localization of *Helicobacter pylori* urease and heat shock protein in human gastric

biopsies. *Infect. Immun.* 65: 1181- 1188.

Escobar L. Pérez-Martín J. y de Lorenzo V. 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181: 6223-6229.

Evans D., Evans D., Engstrand L. y Graham D. 1992. Urease-associated heat shock protein of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 60: 2125- 2127.

Farr S. y Kogoma T. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55: 561-85.

Fassbinder F., van Vliet A., Gimmel V., Kusters J., Kist M. y Bereswill S. 2000. Identification of iron-regulated genes of *Helicobacter pylori* by a modified Fur titration assay (FURTA- Hp). *FEMS Microbiol Lett.* 184: 225- 229.

Fields P., Swanson R., Haideris C. y Heffron F. 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5189- 5193.

Foster J. y Hall H. 1990. Adaptive Acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172: 771- 778.

Foster J. y Hall H. 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173: 5129- 5135.

Foster J. 1993. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J. Bacteriol.* 175: 1981-1987.

Foster J. 1999. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 170- 174.

Garcia del Portillo F., Foster J. y Finlay B. 1993. Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect. Immun.* 61: 4489- 4492.

Giannella R., Broitman S. y Zamcheck N. 1973. Influence of gastric acidity on bacterial and parasitic enteric infections. *Ann. Intern. Med.* 278: 271-276.

Gonzalez de Peredo A., Saint-Pierre C., Adrait A., Jacquamet L., Latour J., Michaud-Soret I. y Forest E. 1999. Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from *Escherichia coli*: chemical modification and mass spectrometry analysis. *Biochemistry.* 38: 8582-8589.

Gonzalez de Peredo A., Saint-Pierre C., Latour J., Michaud-Soret I. y Eric Forest. 2001. Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the Diphtheria toxin repressor. *J.*

Mol. Biol. 310: 83-91.

Goodwin, C., Armstrong J., Chilvers T., Peters M., Colins M., Sly L., McConnel W. y Harper W. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. Nov. As *Helicobacter pylori* comb. Nov. And *Helicobacter mustelae* comb. Nov., respectevly. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 397- 405.

Guifoyle D. y Hirschfield I. 1996. The survival benefit of short- chain organic acids and the inducible arginine and lysine decarboxylase genes for *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. 22: 393- 396.

Hall H. y Foster J. 1996. The role of Fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. J. Bacteriol. 178: 5683-5691.

Horsburgh M., Ingham E. y Foster S. 2001. In *Staphylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. J. Bacteriol. 183: 468-475.

Huesca M., Borgia S., Hoffman P. y Lingwood C. 1996. Acidic pH changes receptor binding of from *Helicobacter pylori*: a binary adhesin model in which surfase heat- shock (stress) protein mediate sulfatide recognition in gastric colonization. Infect. Immun. 64: 2643- 2648.

Huesca M., Goodwin A., Bhagwansingh A., Hoffman P. y Lingwood C. 1998. Characterization of an acidic pH-inducible stress protein (Hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. Infect. Immun. 66: 4061- 4067.

Jungblut P., Bumann D., Haas G., Zimny- Arndt U., Holland P., Lamer S., Siejak F., Aebischer A. y Meyer T. 2000. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiol. 36: 710- 725.

Karita M. y Blaser M. 1998. Acid-tolerance response in *Helicobacter pylori* and differences between cagA+ and cagA- strains. J. Infect. Dis. 178: 213- 219.

Kim N., Weeks D., Jai S., Scott D., Young M. y Sachs G. 2002. Proteins released by *H. pylori* in vitro. J. Bacteriol. 184: 6155-6161.

Kwon Y. y Ricke S. 1998. Induction of acid resistance of *Salmonella typhimurium* by exposure to short- chain fatty acids. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3458- 3463.

Lee I., Slonczewski J. y Foster J. 1994. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 176: 1422- 1426.

- Lin J., Lee I., Frey J., Slonczewski J. y Foster J. 1995. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177: 4097- 4104.
- Marais A., Mendz G., Hazell S. y Mégraud F. 1999. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 642- 674.
- Marshall B., Barrett L., Prakash C., McCallum R. y Guerrant R. 1990. Urea protects *Helicobacter (Campilobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. Gastroenterology 99: 697- 702.
- Matsudaira P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J. Biol. Chem. 262: 10035- 10038.
- McAtee P., Moon L., Fung K., Velligan M., Fry K., Chow T. y Berg D. 1998. Identification o potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 5: 537-542.
- McGee D., Radcliff F., Mendz G., Ferrero R. Y Mobley H. 1999. *Helicobacter pylori* rocF is required for arginase activity and acid protection in vitro but is not essential for colonization of mice or for urease activity. J. Bacteriol. 181: 7314- 7322.
- McGoman C., Necheva A., Cover T. y Blaser M. 1997. Acid-induced expression of oxidative stress protein homologs in *H. pylori*. Gut 41: A18.
- McGowan C., Necheva A., Thompson S., Cover T. y Blaser M. 1998. Acid-induced expression of an LPS- associated gene in *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol. 30: 19- 31.
- Merrell D. y Camilli A. 1999. The cadA gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. Mol Microbiol. 34: 836- 49.
- Merrell D., Bailey C., Kaper J. y Camilli A. 2001. The ToxR mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholera* requires OmpU. J. Bacteriol. 183: 2746- 2754.
- Mekalanos J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. J. Bacteriol. 174: 1- 7.
- Menz G. y Hazell S. 1996. The urea cycle of *Helicobacter pylori*. Microbiology 142: 2959- 2967.
- Meyer- Rosberg K., Scott D., Rex D., Melchers K. y Sachs G. 1996. The effect of environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 111: 886- 900.
- Miller J. y Mekalanos J. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion

mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. J. Bacteriol. 170: 2575-2583.

Miller J. y Mekalanos J. 1989. Coordinate regulation and transduction in the control of bacterial virulence. Science. 243: 916- 922.

Nakamura H., Yoshiyama H., Takeuchi H., Mizote T., Okita K. y Nakazawa T. 1998. Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. Infect Immun. 66: 4832- 4837.

O'Farrell P. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: 4007- 4021.

Olson E. 1993. Influence of pH on bacterial gene expression. Mol. Microbiol. 8: 5- 14.

Owen R. y Bickley J. 1997. Isolation of *H. pylori* genomic DNA and restriction analysis. En C. Clayton y H. Mobley (eds.), *Helicobacter pylori* Protocols. p 81-88. Humana Press, New Jersey.

Pérez- Pérez G., Olivares A., Cover T. y Blaser M. 1992. Characteristics of *Helicobacter pylori* variants selected for urease deficiency. Infect. Immun. 60: 3658- 3663.

Phan- Thanh L. y Montagne A. 1998. Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. J. Gen. Appl. Microbiol. 44: 183- 191.

Quigley E. y Turnberg L. 1987. pH of the microclimate lining human gastric and duodenal mucosa in vivo. Gastroenterology. 92: 1876- 1883.

Recktorschek M., Weeks D., Sachs G. y Melchers K. 1998. Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 115: 628- 641.

Rowbury R. y Googson M. 1997. Metabolites and other agents which abolish the CysB-regulated acid tolerance induced by low pH in log-phase *Escherichia coli*. Recent. Res. Devel. Microbiol. 1: 1- 12.

Sachs G., Meyer- Rosberg K., Scott D. y Melchers K. 1996. Acid, protons and *Helicobacter pylori*. Yale J. Biol. Med. 69: 301- 316.

Sambrook J, Fritsch E., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Slonczwski J. y Foster J. 1996. pH- regulated genes and survival at extreme pH, p. 1539- 1549. In Neidhardt F., Curtis R., Ingraham J., Lin E., Low K. Magasanik B., Reznikoff W., Riley M., Schaechter M. And Umberger H. (ed.), *Escherichia coli* an *Salmonella*: celular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Slonczewski J., McGee D., Phillips J. Y Kirkpatrick C. 2000. PH dependent protein profiles of *H. pylori* analyzed by two-dimensional gels. 5:240-247.

Tao H., Bausch C., Richmond C., Blattner F. y Conway T. 1999. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. J. Bacteriol. 181: 6425- 6440.

Thompson D., Beliaev A., Giometti C., Tollaksen S., Khare T., Lies D., Nealson K., Lim H., Yates III J., Brandt C., Tiedje J. y Zhou J. 2002. Transcriptional and proteomic analysis of a ferric uptake regulator (Fur) mutant of *Shewanella oneidensis*: possible involvement of Fur in energy metabolism, transcriptional regulation, and oxidative stress. Applied and Environmental Microbiology. 68: 881-892.

Thompson S. y Blaser M. 1995. Isolation of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and involvement of the *recA* region in resistance to low pH. Infection and Immunity. 63: 2185-2193.

Thompson S., Latch R. y Blaser M. 1998. Molecular characterization of the *Helicobacter pylori* *uvrB* gene. Gene 209: 113-122.

Toledo H., Valenzuela M., Rivas A. y Jerez C. 2002. Acid stress response in *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol. Lett. 213: 67- 72.

Tomb J., White O., Kerlavage A., Clayton R., Sutton G., Fleishmann R., Ketchum K., Klenk H., Gill S., Dougherty B., Nelson K., Quackenbush J., Zhou L., Kirkness E., Peterson S., Loftus B., Richardson D., Dodson R., Khalk H., Glodek A., McKenney K., Fitzgerald L., Lee M., Adams M., Hickey E., Berg D., Gocayne I., Fujii C., Bwoman C., Watthey L., Wallin E., Hayes W., Borodovsky M., Karp P., Smith H., Fraser C. y Venter J. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature. 338: 539- 547.

Tonello F, Dundon WG, Satin B, Molinari M, Tognon G, Grandi G, Del Giudice G, Rappuoli R, Montecucco C. 1999. The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. Mol Microbiol. 34: 238-246.

Tsuda M., Karita M., Mizote T., Morshed M., Okita K. y Nakazawa T. 1994. Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease- negative mutant constructed by gene replacement. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 6: 49- 52.

van Vliet A., Stoof J, Vlasblom R, Wainwright SA, Hughes NJ, Kelly DJ, Bereswill S, Bijlsma JJ, Hoogenboezem T, Vandenbroucke-Grauls CM, Kist M, Kuipers EJ, Kusters JG. 2002. The role of the Ferric Uptake Regulator (Fur) in regulation of *Helicobacter pylori* iron uptake. *Helicobacter*. 7:237-244.

Waidner B., Greiner S., Odenbreit S., Kavermann H., Velayudhan J., Stähler F., Guhl J.,

Bissé E., van Vliet A., Andrews S., Kusters J., Kelly D., Haas R., Kist M. y Bereswill S. 2002. Essential Role of Ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* Iron metabolism and gastric colonization. *Infect. Immun.* 70: 3923- 3929.

Wang Y. y Taylor D. 1990. Chloramphenicol resistance in *Campylobacter coli*: nucleotide sequence, expression, and cloning vector construction. *Gene.* 94: 23- 8.

Weeks D., Eskandari S., Scott D. y Sachs G. 2000. H⁺-gated urea channel: The link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science.* 287: 482- 485.

Wiedmann M., Arvik T., Hurley R., y Boor K. 1998. General Stress Transcription factor B and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 180: 3650- 3656

Yura T., Nagai T. y Mori H. 1993. Regulation of the heat- shock response in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 321- 350.

Zheng M., Doan B., Schneider T. y Storz G. 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* 181: 4639- 4643.