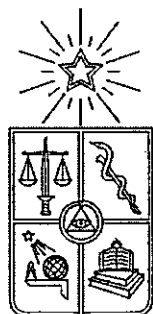


UCH-FC
Biotecnología
E4.13
c.1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO



**CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA
RECEPTORA DE GRUPOS METILOS TIPO DE *Helicobacter
pylori***

OSCAR ALEJANDRO CERDA ARANCIBIA



**SEMINARIO DE TÍTULO ENTREGADO A LA UNIVERSIDAD DE CHILE EN
CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

Director de Seminario de Título: Dr. Héctor Toledo A.

2009



**“CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA
RECEPTORA DE GRUPOS METILOS TlpA DE *Helicobacter pylori*”**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de
los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

OSCAR ALEJANDRO CERDA ARANCIBIA

Dr. Héctor Toledo Araya
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.



Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Carlos Jerez Guevara
Presidente Comisión

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Dr. Francisco Chavez Espinoza
Corrector

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, _____

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta Memoria, quiero agradecer a las personas que de una u otra manera ayudaron al desarrollo de ésta:

A mi familia, Ana María, Jaime, Mónica, José, abuela, tíos y amigos, quienes fueron y siguen siendo un soporte importante en mi vida.

A mi amigo y mentor, el Dr. Héctor Toledo, quien con paciencia y dedicación me guió en mis primeros pasos en el trabajo de laboratorio y la ciencia.

A mis buenos amigos y compañeros de laboratorio Manuel, Nicanor y Cristián, con quienes compartimos interesantes horas de trabajo y discusión.

A mis compañeros, amigos y profesores de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por los buenos años de valiosa formación y aprendizaje.

A todos, muchas gracias.

O.



ÍNDICE DE CONTENIDOS



Índice de contenidos	i
Índice de figuras	iii
Abreviaturas	1
1. Resumen	3
Abstract	5
2. Introducción	6
2.1. Antecedentes	6
2.2. Estructura y función de las proteínas quimiotácticas receptoras de grupos metilos	11
2.3. Transducción de señales en la quimiotaxis bacteriana	18
2.4. <i>Helicobacter pylori</i> y su nicho	25
2.5. Quimiotaxis en <i>H. pylori</i>	27
3. Materiales	32
3.1. Cepas bacterianas	32
3.2. Medios de cultivo	33
3.2.1. Agar Luria Bertani	33
3.2.2. Caldo Luria Bertani	33
3.2.3. Agar Soya Triptona	33
3.3. Antibióticos	34
3.4. Reactivos	34
3.5. Plasmidios	35
3.6. Partidores	36
4. Métodos	37
4.1. Almacenamiento y cultivo de cepas bacterianas	37
4.2. Preparación de DNA cromosomal de <i>H. pylori</i>	38
4.3. Preparación de DNA plasmidial	39
4.4. Amplificación de los ORFs HP0082, HP0099 y HP0103 de <i>H. pylori</i> 26695 y 43504 mediante PCR	39
4.5. Digestiones de DNA con endonucleasas de restricción	40
4.6. Electroforesis en geles de agarosa	40
4.7. Determinación de la concentración de DNA	41
4.8. Purificación de DNA desde geles de agarosa	41
4.9. Purificación de DNA a partir de reacciones de PCR	42
4.10. Obtención de extremos romos en fragmentos de DNA	42
4.11. Fosforilación de insertos	43
4.12. Desfosforilación de vectores plasmidiales	43
4.13. Ligación de fragmentos de DNA	44
4.14. Preparación de células electrocompetentes	45
4.15. Transformación bacteriana con DNA plasmidial	45
4.15.1. Transformación natural de <i>H. pylori</i>	45
4.15.2. Electrotransformación de <i>E. coli</i>	46
4.16. Ensayo de expresión inducida	46

4.17.	Ensayo de quimiotaxis	47
4.18.	Experimentos de movilidad	48
4.19.	Análisis estadístico	49
5.	Resultados	50
5.1.	Experimentos de movilidad en agar blando	50
5.2.	Quimiotaxis en <i>H. pylori</i>	51
5.3.	Amplificación de los genes <i>hp0082</i> , <i>hp0099</i> y <i>hp0103</i>	55
5.4.	Clonamiento del gen <i>hp0099</i>	56
5.5.	Secuenciación del gen <i>hp0099</i>	57
5.6.	Construcción de mutante "knock out" <i>hp0099</i>	59
5.7.	Movilidad en <i>H. pylori</i> OC695	61
5.8.	Quimiotaxis en <i>H. pylori</i> OC695	61
5.9.	Complementación en mutantes <i>mcp</i> de <i>E. coli</i>	62
5.10.	Quimiotaxis en transformantes de <i>E. coli</i>	64
6.	Discusión	68
7.	Conclusiones	75
8.	Referencias	76
9.	Apéndice: Publicaciones generadas por este Seminario de Título.	85



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo del motor flagelar.	9
Figura 2. Correlación entre el nado y la rotación flagelar en <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i> .	10
Figura 3. Representación de un receptor quimiotáctico.	13
Figura 4. El sistema de dos componentes de la vía de transducción de señales quimiotácticas de <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i> .	20
Figura 5. <i>H. pylori</i> 26695, 43504 y OC695 son móviles.	51
Figura 6. <i>H. pylori</i> es atraída por aspartato, serina, arginina y bicarbonato de sodio, pero no por Ni^{2+} .	52
Figura 7. Amplificación mediante PCR de los genes <i>hp0082 (tlpC)</i> , <i>hp0099 (tlpA)</i> y <i>hp0103 (tlpB)</i> a partir de DNA genómico de las cepas 43504 y 26695 de <i>H. pylori</i> .	56
Figura 8. Elemento de inserción mini-IS605 encontrado en el marco de lectura abierto HP0099 de la cepa 43504 de <i>H. pylori</i> .	58
Figura 9. Construcción de mutante <i>H. pylori</i> OC695 (<i>hp0099::cat</i>).	60
Figura 10. La mutación en el gen <i>hp0099</i> anula la capacidad de sensor arginina y bicarbonato de sodio en <i>H. pylori</i> .	62
Figura 11. La expresión del gen <i>hp0099</i> confiere la capacidad de sensor arginina, bicarbonato de sodio y urea a <i>E. coli</i> .	66



ABREVIATURAS



Amp	: Ampicilina.
AMPc	: Adenosina monofosfato cíclica.
ATCC	: American type culture collection.
ATP	: Adenosina trifosfato.
ATPasa	: Adenosina trifosfatasa.
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 560 nm.
EDTA	: Ácido etilendiaminotetracético.
F	: Faradio.
FPM	: Fuerza protón-motriz.
HK	: Proteína histidina quinasa
IPTG	: Isopropil-β-D-tiogalactósido.
Kan	: Kanamicina.
kb	: Kilobase.
kDa	: Kilodalton.
kV	: Kilovolt.
LPS	: Lipopolisacárido.
mA	: Miliamperio.
MCP	: Proteína receptora de grupos metilos.
mM	: Milimolar.
nm	: Nanómetro.
Ω	: Ohm.
ORF	: Marco de lectura abierto.
pb	: Pares de bases.
PBS	: Amortiguador fosfato-salino.
PEG	: Polietilenglicol.
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa.
PM	: Peso molecular.
RCR	: Respuesta quimiotáctica relativa.
RNA	: Ácido ribonucleico.

RNasa	: Ribonucleasa.
RR	: Proteína reguladora de respuesta
rpm	: Revoluciones por minuto.
SDS	: Dodecilsulfato de sodio.
TAE	: Tris EDTA acético.
Taq pol	: DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i> .
Tm	: Temperatura de fusión.
Tris-HCl	: Clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano.
TSA	: Agar soya triptona.
U	: Unidad enzimática.
μ F	: Microfaradio.
UFC	: Unidades formadoras de colonias.
μ l	: Microlitro.
V	: Volt.
x-gal	: bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopirano



1. RESUMEN

La quimiotaxis constituye un mecanismo de adaptación conservado en procariontes. En el caso de *Helicobacter pylori*, el proceso de quimiotaxis constituye además un mecanismo que favorece a la persistencia de esta bacteria en la mucosa gástrica. En el presente trabajo, se demuestra que *H. pylori* ATCC43504 presenta una respuesta quimiotáctica positiva hacia ácido aspártico y serina, pero no a arginina ni bicarbonato de sodio, mientras que *H. pylori* ATCC700392 (cepa 26695) es atraída por estos cuatro compuestos. El ORF HP0099 de *H. pylori* 26695 codifica una de las tres proteínas receptoras de grupos metilos (MCPs) encontradas en su genoma. Por medio de experimentos de secuenciación del ORF HP0099 clonado a partir de las cepas ATCC700392 y ATCC43504, se encontró que en *H. pylori* ATCC43504, este gen se encuentra interrumpido por un elemento de inserción mini-IS605, lo que explica su incapacidad para reconocer la arginina y bicarbonato. A partir de experimentos de inserción en el gen *hp0099* de la cepa ATCC700392, con una cassette de resistencia a cloramfenicol, se confirmaron los resultados obtenidos previamente. Por otra parte, experimentos de complementación genética en *Escherichia coli* con un plásmido que contiene el ORF HP0099 clonado a partir de la cepa ATCC700392 (pHA99) y ATCC43504 (pHA699), mostraron que sólo las primeras recombinantes adquirieron la capacidad de detectar arginina, bicarbonato y urea como atrayentes. En conjunto, estos resultados permiten

concluir que el ORF HP0099 codifica para una MCP que reconoce arginina y bicarbonato como atrayentes.

ABSTRACT

Chemotaxis is a conserved adaptative mechanism in procaryotes. In *Helicobacter pylori*, chemotaxis is also a mechanism involved in the persistence of this bacterium on gastric mucose. In this work, it is shown that *H. pylori* ATCC43504 presents a positive chemotactic response to aspartic acid and serine, but not to arginine nor sodium bicarbonate. However, *H. pylori* ATCC700392 (strain 26695) is attracted by these four compounds. In *H. pylori* 26695, ORF HP0099 encodes for one of the three methyl accepting proteins (MCPs) genes found in its genome. The sequencing of ORF HP0099 showed that it was interrupted by a mini-IS605 insertion element in *H. pylori* ATCC43504, that explains its inability to recognize arginine and bicarbonate. Inactivation of the *hp0099* gene from ATCC700392 strain by insertion of a chloramphenicol resistance cassette results in a negative phenotype to arginine and bicarbonate chemotaxis. That result confirms the loss of function due to the mini IS605 insertion element into the *hp0099* gene from *H. pylori* 43504. Genetic complementation experiments in *Escherichia coli* with a plasmid containing ORF HP0099 cloned from ATCC700392 (pHA99) and ATCC43504 (pHA699) strains showed that only the pHA99 recombinant strain acquired the ability to sense arginine, bicarbonate and urea as attractants. Taken together, these results suggest that ORF HP0099 encodes for a MCP that recognizes arginine and bicarbonate as attractants.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Antecedentes

La capacidad de responder a los cambios medioambientales es vital para la supervivencia en el amplio rango de la vida. Desde los microorganismos a los mamíferos superiores, éstos han desarrollado evolutivamente, mecanismos que les permiten adaptarse y responder a los diversos estímulos que impone el medio circundante.

La mayoría de las bacterias viven en ambientes dinámicos y emplean sistemas de procesamiento de la información para monitorear los cambios que ocurren a su alrededor. Estos cambios pueden incluir variaciones en la temperatura, el pH, la luz, el potencial eléctrico, el magnetismo y los compuestos químicos. Como respuesta a estas alteraciones, los microorganismos desarrollan cambios en su fisiología, virulencia y su localización, que les permiten adaptarse o encontrar sectores más apropiados para su persistencia. La quimiotaxis es el movimiento dirigido de un organismo hacia condiciones ambientales favorables consideradas como atrayentes o de alejamiento desde ellas, denominadas nocivas o repelentes.

En el movimiento de las bacterias flageladas, está involucrada una secuencia de períodos de natación suave y en forma recta intercaladas por

cambios de dirección intermitentes. En especies multiflageladas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* esta relación temporal entre periodos de natación suave y tumbos es el resultado del sentido de rotación de los flagelos que es dependiente de las concentraciones de los compuestos químicos que son detectados por la bacteria y están dados por la variación en la dirección de rotación del flagelo.

El flagelo es un organelo rígido de aproximadamente 20 nm de diámetro constituido por proteínas denominadas flagelinas, codificadas por los genes *fla*. Se conocen cinco proteínas involucradas en la generación del torque necesario para el movimiento del flagelo: MotA, MotB, FliG, FliM y FliN. El complejo MotA/MotB es responsable de la conductancia de protones y funciona como la unidad generadora de torque. Se ha postulado que MotB está anclado al peptidoglicán, por lo que se supone que el complejo MotA/MotB es el estator del motor flagelar. Las proteínas FliG, FliM y FliN forman el anillo C, que está ensamblado en el lado citoplasmático del anillo MS y que corresponde al rotor del motor flagelar y están involucradas en la generación de torque y en el cambio de dirección del flagelo (Figura 1) (Wadhams y Armitage, 2004).

Debido a que los flagelos tienen estructura levógira, cuando los filamentos rotan en dirección antihoraria (CCW), éstos se organizan en una especie de manojo y generan un efecto propulsor para la bacteria, produciéndose la natación con una trayectoria lineal. Esta conformación permite el impulso de la

célula a velocidades de hasta 40 $\mu\text{m/s}$ dependiendo de la viscosidad del medio.

Sin embargo, cuando los flagelos rotan en sentido horario (CW), el manojito de flagelos se deshace, lo que provoca que la célula presente movimientos al azar en los que se reorienta sin que exista desplazamiento. En la rotación CW, cada filamento flagelar trabaja de forma no coordinada, por lo que se generan fuerzas en diferentes direcciones por lo que no hay desplazamiento neto (Figura 2) (Wadhams y Armitage, 2004).

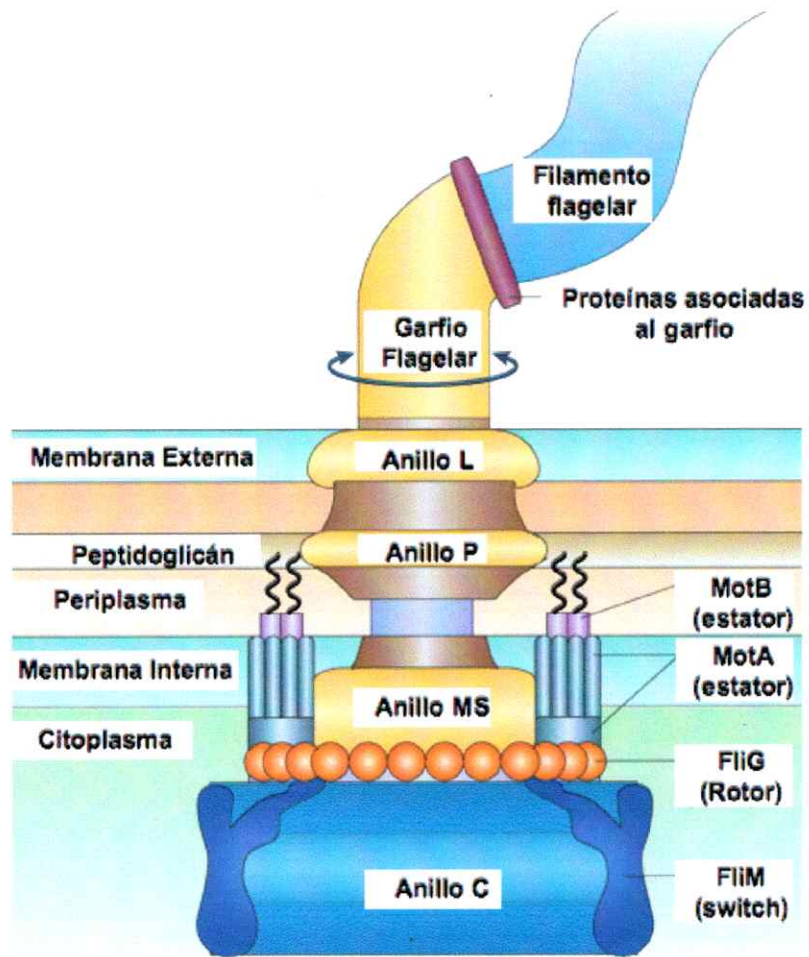


Figura 1. Esquema representativo del motor flagelar (adaptado de Wadhams y Armitage, 2004).

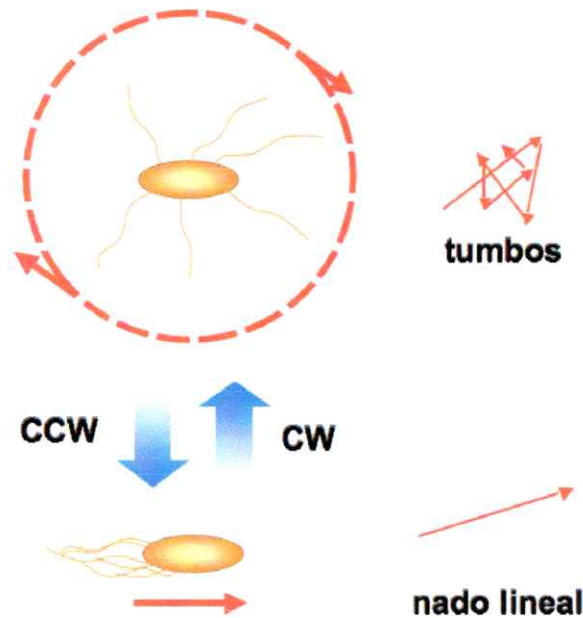


Figura 2. Correlación entre la natación y la rotación flagelar en *S. typhimurium* y *E. coli*.
 (CW: rotación en sentido horario) (CCW: rotación en sentido antihorario)

Hay tres clases de proteínas que son esenciales en el proceso de quimiotaxis: los receptores de transmembrana, los componentes de señalización citoplasmáticos y las enzimas involucradas en la adaptación. Todas éstas están involucradas en el sistema de transducción de señales que transmiten los estímulos extracelulares detectados por los receptores al motor flagelar.

2.2. Estructura y función de las proteínas quimiotácticas receptoras de grupos metilos.

Las señales químicas que varían en el entorno de las bacterias y arqueas son detectadas en su mayoría por las llamadas proteínas quimiotácticas receptoras de grupos metilos (MCPs). Estas proteínas se ubican en uno de los polos de la célula, posición altamente conservada en especies pertenecientes a ambos dominios (Gestwicki y col., 2000) y transducen la señal química ambiental hasta la respuesta flagelar, mediante su interacción con el sistema de dos componentes CheA/CheY.

La estructura de estas proteínas está altamente conservada y están constituidas por una serie de α hélices: una corta extensión citoplasmática del extremo N-terminal, seguida de un segmento hidrófobo de transmembrana, una región periplasmática, la que une al ligando a sensar, un segundo dominio de transmembrana y un dominio citoplasmático, el que contiene regiones de metilación y de interacción con CheA y CheW (Webre y col., 2004).

Mediante proteólisis del receptor *tar* de *E. coli*, se obtuvo el denominado dominio de transmembrana y señalización, de 29 kDa por subunidad, el que contiene una región de transmembrana sumada al dominio sensor periplasmático (Mowbray y col., 1985). El dominio sensor es el que reconoce señales químicas específicas, lo que inicia los eventos que alteran el estado del

receptor. En la mayoría de los casos, el dominio sensor se encuentra en el periplasma donde reconoce una proteína de unión a ligando soluble o al atrayente directamente (Surette y Stock, 1996). Los quimiorreceptores de este tipo y sus respectivos efectores, son: *tar* (que identifica aspartato, la proteína de unión a maltosa y Ni^{2+}), *tsr* (que reconoce serina y H^+), *trg* (que reconoce la proteína de unión a ribosa y la proteína de unión a galactosa/glucosa), *tap* (que identifica la proteína de unión a dipéptidos) y *tcp* (que reconoce la proteína de unión a citrato y citrato). Se ha estudiado un sexto receptor (*aer*) involucrado en aerotaxis que regula del mismo modo al sistema de dos componentes CheA/CheY. Este receptor contiene FAD asociado a su extremo N-terminal en el citoplasma y sensa el potencial redox (Bespalov, 1996; Bibikov y col, 1997).

En el caso del receptor *tar* de *E. coli*, el dominio periplasmático consiste en un homodímero de 19 kDa cada subunidad (Milligan y col., 1993; Danielson y col, 1994). Estudios cristalográficos de este dominio aislado, revelan que cada subunidad está compuesta por cuatro α hélices antiparalelas, denominadas α_1 , α_2 , α_3 y α_4 , formando un dímero cilíndrico de 20 Å de diámetro y 70 Å de largo (Milburn y col., 1991). Los sitios de unión a aspartato se encuentran en la interfase de las dos subunidades, cercanos al extremo periplasmático del dominio sensor (Figura 3).

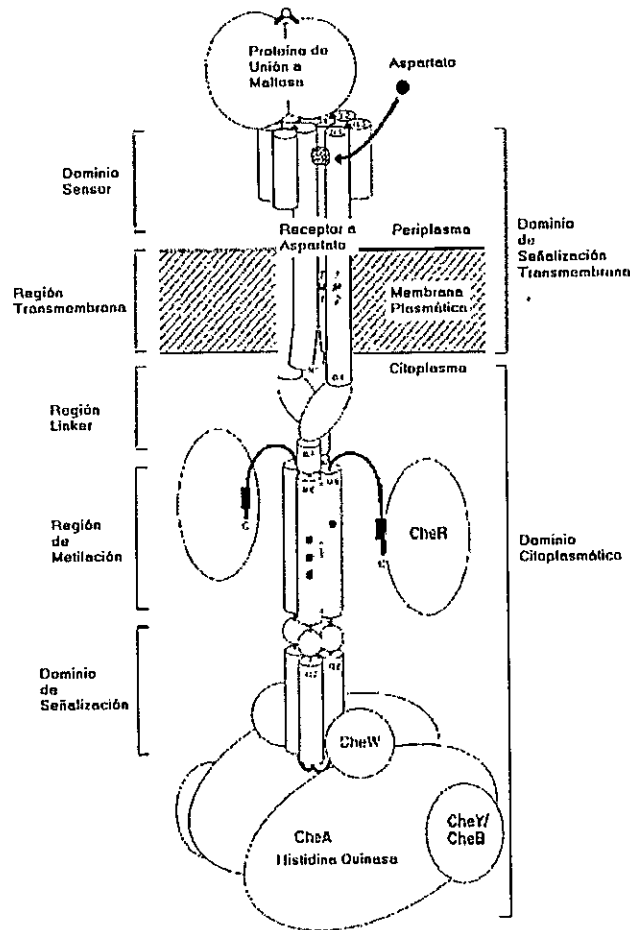


Figura 3. Representación de un receptor quimiotáctico. La conformación estable del complejo está constituida por el complejo ternario compuesto por dímeros del receptor, las proteínas de andamiaje CheW y la histidina quinasa CheA. Los otros componentes de este complejo se encuentran en rápido equilibrio entre fijo y formas solubles, incluidos las proteínas adaptadoras periplasmáticas, la metiltransferasa CheR, la metilesterasa CheB, y el regulador de respuesta CheY que modula la rotación del flagelo (adaptado de Falke y col., 1997).

La unión de aspartato a uno de los sitios de unión inhibe cooperativamente la unión de una segunda molécula de aspartato al sitio de la otra subunidad (Jeffery y Koshland, 1994), lo que también se observó en el receptor tsr de *E. coli* y en el caso del reconocimiento de las proteínas de unión (Lin y col, 1994; Stoddard y Koshland, 1992; Gardina y col, 1997), lo que hace pensar en un mecanismo de control característico para los quimiorreceptores. Aspartato se une al sitio de unión con alta afinidad por contactos directos con las hélices α_1 y α_4 de una de las subunidades, además de contactos suplementarios a α_1 de la otra subunidad, proveyendo un arreglo de puentes de hidrógeno y salinos a nivel receptor-ligando y receptor-solvente-ligando, los que estarían involucrados en la especificidad del quimioefector (Milburn y col., 1991).

El dominio transmembrana de las MCPs está constituido por dos α hélices: TM1 y TM2 por monómero. Diversos estudios del receptor *tar* de *E. coli* revelaron que la hélice α_4 /TM2 es la que transmite la señal transmembrana, mientras que las otras hélices permanecen imperturbables. Este movimiento es inducido por la unión de aspartato, el que al unirse a tres residuos de arginina localizados en el sitio activo, provoca un reacomodo que genera un desplazamiento similar al efectuado por un pistón de 1,6 Å de la hélice α_4 /TM2 hacia el citoplasma. (Falke y col, 1997).

La hélice α_4 /TM2 entra en el citoplasma, donde continúa el dominio citoplasmático, empezando con una región de 30 residuos, denominada región

"linker", que estaría involucrada en la transmisión de la señal desde α_4 /TM2 al dominio citoplasmático (Tatsuno y col., 1996, Gardina y Manson, 1996). Los últimos 15 aminoácidos tienen una periodicidad para una posible α hélice (α_5) (Danielson y col., 1997), seguido de una posible vuelta entre las hélices α_5 y α_6 .

Siguiendo a la región linker, se encuentra el primero de los dos segmentos de metilación involucrados en la adaptación al estímulo quimiotáctico. El primer segmento es esencial para la regulación de CheA. Los sitios de metilación son principalmente las cadenas laterales de residuos glutamato que, en algunos casos, son generados por deamidación de glutamina por CheR. Ambos segmentos de metilación, MH1 y MH2, corresponden a α hélices (α_6 y α_9) (Stock y col., 1991, LeMoual y Koshland, 1996, Danielson, 1997). El primer segmento contiene en α_6 , tres sitios de metilación, mientras que el segundo contiene uno o dos sitios, dependiendo del tipo de quimiorreceptor (Kehry y col., 1983, Terwilliger y Koshland, 1984, Nowlin y col., 1987). Ambas hélices son anfipáticas, exhibiendo una cara hidrófoba y una cara cargada, la que contiene los residuos de metilación y reconocimiento (Danielson y col., 1997) La cara hidrófoba de las hélices α_6 de ambas subunidades se asocian formando una hélice coiled coil paralela en la interfase entre las subunidades, mientras que las hélices α_9 forman un ovillo antiparalelo de cuatro hélices (Figura 3) (Stock y col., 1991, Danielson y col., 1997).

En la regulación de la región de metilación, se propuso que la interfase entre las subunidades sirve como un dímero que hace las veces de "switch" que controla la actividad quinasa. La máxima actividad es provista por una óptima configuración de la interfase, mientras que la actividad es deprimida por disturbios en la interfase por desplazamientos de la hélice α_4 /TM2 o por un estado alterado de metilación. Por otra parte, en un estado de desmetilación total, los grupos carboxilatos aniónicos regulan negativamente la actividad quinasa 50 veces relativo al efecto de un receptor completamente metilado (Ninfa y col., 1991, Borkovich y col., 1992). Una interacción clave que define un estado de señal de la región de metilación, es el contacto extensivo entre las hélices α_6 que forman la interfase entre las subunidades y posee la mayoría de los sitios de metilación (Danielson y col., 1997, Cochran y Kim, 1996, Surette y Stock, 1996).

La región final del dominio citoplasmático forma un complejo ternario con CheW y CheA y es responsable de la regulación de la actividad quinasa. Esta región correspondiente a los 16 kDa entre las dos hélices de metilación, estaría compuesta por dos hélices por subunidad (α_7 y α_8) y es la región más conservada de la superfamilia de los dominios citoplasmáticos procariontes (LeMoual y Koshland, 1996, Danielson, 1997).

Los quimiorreceptores se encuentran anclados a la membrana en forma de homodímeros estables de subunidades de aproximadamente 60 kDa (Stock y

col., 1991). Este receptor dimérico, se encuentra asociado en su extremo citoplasmático con las proteínas CheW y CheA conformando un complejo ternario altamente estable independiente de unión de un ligando al receptor (Stock y col., 1991; Wadhams y Armitage, 2004). Estos dímeros, a su vez, se asocian en trímeros, los que conforman "equipos" de receptores de distintos tipos, en los que se establecerían múltiples interacciones intra e inter dímeros constituyentes de estos equipos y que tendrían implicancias en la magnificación y adaptación frente al estímulo. Un modo posible de interacciones entre los receptores se propuso a partir de la estructura cristalina del dominio citoplásmico de serina de *E. coli* (Tsr), que muestra un trímero de dímeros de receptores, conectado por las puntas (Kim y col, 1999). Experimentos de entrecruzamiento in vivo apoyan la hipótesis de una estructura trimérica, aunque otros tipos de organización no pueden descartarse (Ames y col, 2002; Homma y col, 2004; Studdert y Parkinson, 2004; Studdert y Parkinson, 2005). Se sugirió además que CheA y CheW son necesarios para la formación de estas agrupaciones, ya que se observó una disminución de trímeros en ausencia de estas proteínas en experimentos de microscopía electrónica (Maddock y Shapiro, 1993) e inmunofluorescencia (Sourjik y Berg, 2000) Esto llevó a un modelo de estructura hexagonal, en la que los trímeros de dímeros estarían conectados por dímeros de CheA y CheW (Shimizu y col, 2000).

2.3. Transducción de señales en la quimiotaxis bacteriana.

Los sistemas de dos componentes son frecuentemente utilizados en la transducción de señales en todos los dominios, aunque se encuentran en mayor distribución en *Archaea* y *Bacteria*. En su forma más simple, éstos consisten en la asociación de dos familias de proteínas, una histidina quinasa (HK) que recibe la señal extracelular induciendo su autofosforilación, la que posteriormente fosforila a un regulador de respuesta (RR) en un residuo de aspartato altamente conservado que puede actuar como factor transcripcional o interactuar con otras proteínas (Wadhams y Armitage, 2004).

La transducción de señales en el mecanismo de quimiotaxis es mediada por un sistema de dos componentes conformado por la histidina quinasa CheA y por los reguladores de respuesta CheB y CheY, en el cual la señal que desencadena el proceso de transducción es la disminución en la ocupación del receptor (Figura 4).

Este sistema está acoplado al receptor de transmembrana mediante la interacción con CheW, que está plegada como proteína de andamiaje, conformándose un complejo ternario MCP/CheW/CheA.

En ausencia de un gradiente químico, una célula bacteriana ejecuta un desplazamiento tridimensional en forma azarosa, consistente en períodos de natación recta espaciados por volteretas, en los que la célula se detiene brevemente y se reorienta al azar en una nueva dirección. Cuando se encuentra en presencia de un gradiente de atrayente o repelente, la bacteria monitorea el cambio de la concentración local nadando en distintas regiones del gradiente. Si una bacteria nada hacia una región donde la concentración del atrayente es mayor, los quimiorreceptores detectan este incremento y envían una señal al motor de propulsión, que disminuye la probabilidad de ejecución de volteretas, aumentando el período de natación recto y suave. De forma opuesta, si la célula detecta una disminución en la concentración del atrayente o un aumento en la de repelente, aumenta la probabilidad de volteretas y los períodos de nado recto disminuyen, con mayor variación en la dirección natatoria. El efecto neto de esta regulación temporal consiste en cambiar el nado al azar por un nado dirigido, que resulta en una orientación de la bacteria hacia un gradiente de atrayente o en un alejamiento de un gradiente de repelente.

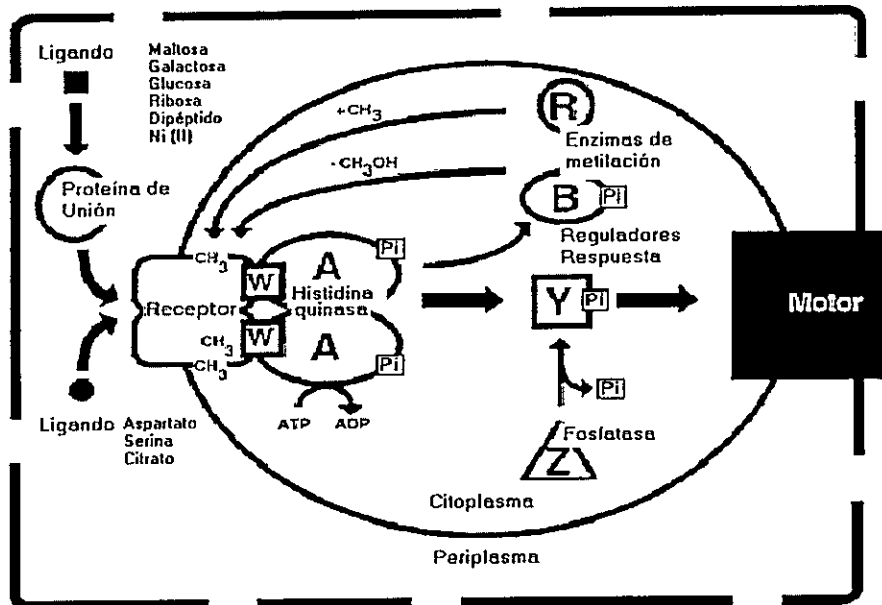


Figura 4. El sistema de dos componentes de la vía de transducción de señales quimiotácticas de *E. coli* y *S. typhimurium*. Las sustancias atrayentes y repelentes se unen en el espacio periplasmático a receptores de transmembrana específicos o a proteínas adaptadoras solubles que, a su vez, se unen a receptores de transmembrana. Los receptores de transmembrana están asociados a través de la proteína de andamiaje CheW a la histidina quinasa citoplásmica CheA, que a su vez fosforila a los dos reguladores de respuesta CheB y CheY. La fosforilación de CheB (CheB-P) modula la adaptación del sistema en el cual CheR metila residuos específicos de glutamato en el lado citoplásmico del receptor, mientras que CheB-P hidroliza dichas modificaciones. El estado de equilibrio en el nivel de metilación de los receptores está dado por la acción opuesta de CheR y CheB. Por otra parte, la fosforilación de CheY modula la rotación del motor flagelar, favoreciendo el nado lineal de las bacterias. Esta cadena de eventos es finalizada por la desfosforilación de CheY-P que puede ser catalizada por ella misma o por la fosfatasa CheZ (Adaptado de Falke y col., 1997).

La señalización quimiotáctica, involucra un proceso de transducción de transmembrana como primer paso, donde la ocupación de un receptor por su ligando en su dominio periplasmático, resulta en cambios en la actividad de CheA y en los niveles de metilación del receptor. Estos cambios enzimáticos son inducidos por un cambio conformacional en las MCPs en presencia de sus respectivos ligandos. El dominio sensor de uno de los monómeros sufre un rearrreglo en presencia de atrayente, induciendo al desplazamiento del segmento α_4 /TM2, el que seguiría un movimiento similar al de un pistón hacia el citoplasma, resultando en la inhibición cooperativa de CheA. El incremento en la metilación adaptativa, provocaría el desplazamiento hacia el periplasma y reacomodo de TM2, reactivándose CheA. La unión de un ligando al receptor provoca un cambio conformacional en esta proteína, que inhibe cooperativamente a CheA, descendiendo los niveles de CheY y CheB fosforilado, disminuyendo la frecuencia de volteretas y aumentando el tiempo de natación suave de la bacteria (Figura 4) (Aizawa y col., 2000).

En ausencia de ligando, la actividad de CheA está aumentada, por lo que la fosforilación de CheY y CheB es incrementada. La fosforilación de CheB lleva a un aumento de su actividad metiltransferasa/amidasa, lo que incrementa la metilación de los residuos de glutamato y glutamina de las regiones MH1 y MH2 de los receptores quimiotácticos. El nivel basal de CheY-P sirve como una señal difusible que controla la ejecución de volteretas. Esta señal está modulada por

dos reacciones opuestas: la creación de CheY-P por efecto del complejo receptor-quinasa y la hidrólisis de CheY-P, que es acelerada por CheZ. CheZ acelera la hidrólisis de CheY-P mediante un ataque nucleofílico de su sitio activo o por un cambio conformacional que estimula la actividad autofosfatasa de CheY (Hess y col, 1988). Esta actividad es esencial para una rápida respuesta, puesto que una bacteria sensa un estímulo y modula la señal de volteretas en aproximadamente 1 s, mientras que la vida media de CheY-P es de 10 s.

CheY-P actúa como señal para volteretas mediante la interacción con FliM, la que compone el "switch" que controla el estado rotacional del motor flagelar (Figura 4). FliM se encuentra en el anillo C del flagelo, estructura que se proyecta hacia el citoplasma (Francis y col., 1994), en aproximadamente 40 copias (Zhao y col., 1996) y une con mayor afinidad a CheY-P que a CheY (Welch y col, 1993, 1994). Esta interacción, provoca el cambio de rotación del flagelo en sentido horario (CW), aumentando la frecuencia de tumbos de la bacteria (Figura 2).

Por otra parte, el aumento en la concentración de CheB-P lleva a la adaptación del sistema que permite que la célula se "adapte" a una condición constante del estímulo. Este mecanismo es controlado por un "loop" de retroalimentación que modifica covalentemente a múltiples residuos de glutamato y glutamina altamente conservados en la región citoplasmática de cada receptor. Los grupos carboxilos de esos residuos son metilesterificados por

la enzima metiltransferasa CheR, que se une al extremo C-terminal del receptor. Los metilesteres resultantes, que incrementan la señal de activación de CheA por el quimiorreceptor, son hidrolizados por la metilesterasa CheB. Las tasas relativas de metilación y desmetilación determinan el estado basal de metilación del receptor y el control de esta retroalimentación de la adaptación es generado por el complejo receptor-quinasa, que fosforila a CheB, causando su activación. Como resultado, el receptor controla su propio nivel de metilación, que cambia cuando, por ejemplo, un repentino aumento en la concentración de atrayente deprime la actividad de CheA, responsable de la activación de CheB. Debido a que el nivel de CheB-P disminuye espontáneamente por su desfosforilación, la tasa constante de actividad metiltransferasa de CheR incrementa gradualmente el número de residuos glutamatos modificados por receptor. Eventualmente, el aumento en el nivel de metilación de los receptores estimula la actividad de CheA, contrarrestando el efecto del atrayente unido al receptor y restaura la señal a un estado basal. Este proceso ocurre globalmente en todos los receptores de la célula, por lo que cuando se encuentra completamente adaptada, el nivel de metilación neto corresponde al efecto de múltiples señales atrayentes y repelentes.

El nivel de metilación de un receptor también provee un mecanismo de memoria que permite a la bacteria seguir una dirección favorable hacia una mayor concentración de atrayente, es decir, si la concentración de atrayente reciente fue alta, el nivel de metilación es alto y lo opuesto si estuvo en

presencia de una concentración menor. El sistema de memoria para sustancias repelentes funciona de una manera idéntica, pero con una polaridad inversa.

Existe gran diversidad en el procesamiento de la información en la quimiotaxis, donde participan una serie de proteínas accesorias al sistema descrito en *E. coli* y *S. typhimurium*. *Bacillus subtilis* por ejemplo, tiene, además de los componentes CheWAYRB, otros componentes, incluyendo las proteínas CheV, CheD y CheC (Szurmant y Ordal, 2004). Karatan y col. (2001) demostraron que CheV fosforilado está involucrado en la adaptación a estímulos atrayentes en *B. subtilis*. CheV es una proteína de dos dominios con un extremo N-terminal homólogo a CheW y un C-terminal con un dominio de regulador de respuesta de dos componentes homólogo a CheY, que incluye la presencia del residuo D235 fosforilable en esta proteína (Rosario y col, 1994). CheD estaría involucrada en la deamidación de residuos glutamina en los quimiorreceptores, haciéndolos sensibles a metilación, contribuyendo a la adaptación del sistema en presencia de quimioefectores (Kistich y Ordal, 2002), mientras que CheC se asociaría con los componentes flagelares, favoreciendo la disociación de CheY-P y por ende, la adaptación (Kirby y col, 2001). En el caso de las bacterias no entéricas, no hay variación en el sentido de rotación flagelar, sino que el control de la orientación se ejerce modificando la velocidad del nado. Estas bacterias poseen dos homólogos de CheY fosforilables por CheA, denominados CheY1 y CheY2. En cepas mutantes para *cheY2*, se observó que efectuaban un nado rápido y que eran incapaces de responder a estímulos quimiotácticos, mientras

que las mutantes *cheY1* nadan lentamente, pero al encontrarse ante una concentración de un quimioefector, se observó un aumento en la velocidad de nado y débil respuesta quimiotáctica. Esto hizo suponer que CheY2 disminuye la velocidad de rotación flagelar en respuesta a estímulos quimiotácticos negativos, cambiando la dirección de nado de la célula. En estas bacterias, no existe CheZ que acelera la desfosforilación de CheY-P, sin embargo, se ha postulado que CheY1 la reemplazaría mediante una retrofosforilación desde CheY2-P a CheA. Posteriormente, CheA-P fosforila a CheY1 que actuaría como fosfatasa, reteniendo el grupo fosfato y que tendría una baja actividad de señalización (Sourjik y Schmitt, 1996).

2.4. *Helicobacter pylori* y su nicho.

H. pylori es una bacteria Gram-negativa de forma espiral, perteneciente a la familia de las δ/ϵ proteobacterias, que coloniza el estómago humano y es considerado como agente etiológico de patologías como gastritis, úlcera gástrica y duodenal y constituye un factor de riesgo en la adquisición de adenocarcinoma gástrico y linfoma tipo MALT (Sachs y col., 2003). Esta bacteria es microaerófila y móvil en soluciones viscosas. Su movilidad es conferida por un manojito de seis a ocho flagelos posicionados en uno de los extremos de la bacteria.

El jugo gástrico posee un pH menor a 4,0, el cual le confiere un carácter bactericida y por lo tanto, capaz de eliminar a muchas de las bacterias que llegan al estómago en la ingesta de alimentos. Por lo tanto, la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* implica la capacidad de ésta para sobrevivir en este ambiente ácido. Una de las claves para la sobrevivencia en estas condiciones reside en la producción de ureasa (Eaton y col., 1991). Esta enzima cataliza la hidrólisis de urea produciendo amoníaco y dióxido de carbono, que neutralizan el pH ácido del estómago y forman un ambiente neutro que rodea a la bacteria en el lumen gástrico (Dunn y col., 1990; Meyer-Rosberg y col., 1996; Rektorschek y col., 1998) y representa un 5% de la cantidad total de proteínas citoplasmáticas de este microorganismo (Hu y Mobley, 1990). Si bien esta proteína carece de señal de exportación, se ha observado que sobre un 30 % de la ureasa de *H. pylori* está adherida a la membrana externa de la bacteria, producto de la llamada "autólisis altruista", que corresponde a la lisis espontánea de algunas bacterias seguida de la adsorción de su ureasa liberada en las membranas externas de las células vivas (Phadnis y col., 1996, Dunn y col., 1997). Esta enzima posee un peso molecular de 600 kDa y está codificada en el operón *ure*, que está constituido por siete genes denominados *ureA* a *ureG* (Sachs y col., 2003). Los dos primeros, *ureA* y *ureB*, codifican las subunidades de 26,5 kDa y 60,3 kDa, respectivamente. Los genes *ureC*, *ureD*, *ureE*, *ureF* y *ureG* están involucrados en el ensamblaje de la enzima (Sachs y col., 2003) y son homólogos a los que codifican para la ureasa de *Proteus mirabilis* y *Klebsiella aerogenes*. Adicionalmente el operón *ure* contiene el gen *ureI*, que

codifica para un canal de urea, el cual es esencial para la persistencia de la bacteria (Sachs y col., 2003).

La colonización de la mucosa gástrica requiere que primero la bacteria atraviese la capa de mucus que protege al epitelio gástrico, acción que se logra por la capacidad de nado que posee *H. pylori*, seguida a su adhesión al epitelio, lo que lleva a la inducción de gastritis (Hessey y col., 1990). Esta adherencia ocurre mediante la interacción de proteínas denominadas adhesinas. Muchas cepas de *H. pylori* expresan adhesinas, las que unen macromoléculas específicas superficiales del epitelio gástrico (Sachs y col., 2003). La interacción adhesina-receptor mejor descrita es la que se establece entre la adhesina BabA, un miembro de una familia de proteínas de membrana externa, y el antígeno de Lewis b y los relativos a los antígenos sanguíneos ABO (Borén y col., 1993, Ilver y col., 1998). Estos antígenos se encuentran en los glóbulos rojos y la mucosa gastrointestinal, lo que sumado a adhesión a la mucosa gástrica causa la inducción y liberación de citoquinas proinflamatorias.

2.5. Quimiotaxis en *H. pylori*.

A partir del genoma secuenciado de la cepa 26695 de *H. pylori*, (Alm y col., 1999; Tomb y col., 1997), se puede predecir que la señalización en la quimiotaxis de *H. pylori* difiere del paradigma de las enterobacterias. En el genoma de *H. pylori* se han identificado al menos 34 genes relacionados con

estructura y síntesis del flagelo, además de 9 genes implicados en el proceso de quimiotaxis dentro de los que se encuentran tres MCPs, correspondientes a los ORFs HP0082, HP0099 y HP0103, homólogos a los genes *tlpC*, *tlpA* y *tlpB* de *B. subtilis*, respectivamente, que probablemente sensen ligandos del espacio extracelular y un ortólogo a una MCP soluble (HP0599), que codificaría para una proteína homóloga al receptor *Aer* de *E. coli*. que podría responder a variaciones en el potencial redox o a otras señales fisiológicas internas. Además, posee un ortólogo para la proteína de acoplamiento CheW (HP0391), una histidina quinasa CheA que contiene en su extremo C-terminal un dominio homólogo al dominio fosforilable de CheY (CheAY2/HP0392), un regulador de respuesta independiente CheY (CheY1/HP1067) y un ortólogo a CheZ (HP0170) (Terry y col., 2006). *H. pylori* no posee genes ortólogos codificantes para la metiltransferasa CheR ni para la metilesterasa CheB, que en *E. coli* son parte del mecanismo de adaptación del sistema de transducción de señales quimiotácticas, que actúa a través de la modulación de los MCPs para inducir la autofosforilación de CheA a través de la metilación reversible de residuos de ácido glutámico en la región citoplásmica de las MCPs. Interesantemente, los MCPs de *H. pylori* contienen varios de los residuos de glutamato conservados del dominio de metilación y los organismos cercanos como *Helicobacter hepaticus*, *Campylobacter jejuni* y *Wolinella succinogenes* codifican ortólogos de CheR y CheB, sin embargo, las proteínas CheB de estos organismos no contienen dominios receptores (Parkhill y col., 2000; Baar y col., 2003; Suerbaum y col., 2003). *H. pylori* contiene tres ortólogos de la proteína CheV de *B. subtilis*

que participa en la adaptación a atrayentes en este organismo, correspondientes a los marcos de lectura abiertos HP0019 (CheV1), HP0616 (CheV2) y HP0393 (CheV3) (Karatan y col.,2001). Pittman y col. (2001) demostraron que la delección de *cheV1* reduce significativamente el nado de *H. pylori*, mientras que la movilidad se mantuvo sin cambios en los mutantes de inserción de *cheV2* y *cheV3* y en un doble mutante *cheV2/cheV3*, por lo que los mecanismos de adaptación por *H. pylori* siguen sin ser dilucidados.

En el genoma de *H. pylori* no se encuentran ortólogos de la fosfatasa CheZ que participa en la señal de terminación en las β y γ Proteobacterias. Sin embargo, la presencia de una proteína CheY proteína fusionados al extremo C Terminal de la histidina quinasa CheA (CheY2) así como de un regulador de respuesta independiente CheY (CheY1) hace pensar en que el modelo de transducción quimiotáctica de *H. pylori* se asemeja al de *Sinorhizobium meliloti*. Este organismo codifica dos proteínas CheY que son fosforilados rápidamente a la vez por CheA. Sin embargo, sólo una proteína CheY (CheY2) interactúa con las proteínas del motor flagelar cuando éste se fosforila, controlando la rotación flagelar directamente, mientras que la segunda proteína CheY (CheY1) funciona como un modulador de la respuesta quimiotáctica drenando grupos fosfatos desde CheY2-P, mediante su fosforilación por la histidina quinasa CheA. Debido a que CheY1 está presente en *S. meliloti* en un exceso de diez veces más que CheA, esta retrofosforilación de CheY1 constituye un mecanismo eficaz para la defosforilación de CheY2-P en ausencia de la fosfatasa CheZ (Schmitt, 2002).

Eaton y col. (1996) describieron que la capacidad de movilizarse juega un papel importante en la colonización del epitelio gástrico por esta bacteria. Experimentos de colonización en ratones con cepas que contienen mutaciones en los genes *flaA* y *flaB*, mostraron un menor número de bacterias recuperadas a partir de biopsias gástricas en comparación a cepas silvestres. Además, se demostró que cepas mutantes para los potenciales receptores quimiotácticos TlpA y TlpC presentan deficiencias en la colonización cuando se coinfectan ratones con éstas y cepas silvestres, por lo que se podría pensar que la capacidad de respuesta quimiotáctica constituiría un mecanismo adaptativo en relación a la competencia por el nicho frente a otras cepas (Andermann y col., 2002). Sin embargo, las identidades de los ligandos reconocidos por estos receptores aún no son dilucidadas. Por otra parte, Croxen y col. (2006) demostraron que TlpB es necesaria para la capacidad de sensor H^+ y para la colonización del estómago en ratones.

Debido a que la quimiotaxis se ha constituido en un factor importante para la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*, el estudio de la maquinaria molecular y sus componentes implicados en este proceso es relevante. De esta manera, el conocimiento de la función y los ligandos de los receptores quimiotácticos (MCPs) de *H. pylori* puede tener una potencial utilidad terapéutica, por lo que se postula que:

Objetivo general

Identificar las posibles proteínas receptoras de grupos metilos (MCPs) en *Helicobacter pylori*.

Objetivos específicos

1. Determinar sustancias atrayentes y/o repelentes en las cepas ATCC700392 y ATCC43504 de *Helicobacter pylori*.
2. Clonar y caracterizar los ORFs identificados como MCPs en *Helicobacter pylori*.

3. MATERIALES

3.1. Cepas bacterianas

H. pylori ATCC43504, la que se indicará como cepa 43504.

H. pylori ATCC700392, correspondiente a la cepa 26695 cuyo genoma está secuenciado.

H. pylori OC695, $\Delta hp0099:: cat$ (cam^R) isogénica de la cepa ATCC700392, construida en este trabajo.

E. coli DH5 α ($\Phi 80$ d_ *lacZ* $\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, *deoR*, *recA1*, F' *endA1*, *gyr A96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_k^- , r_k^+), *sup E44*, *rel A1*) de Gibco BRL.

E. coli RP437 *thr* (*Am*)-1 *leu B6 his-4 metF* (*Am*)159 *eda-50 rpsL136* (*thi-1 ara-14 lacY1 mtl-1 xyl-5 tonA31 tsx-78*), cedida por el Dr. J S. Parkinson

E. coli RP4372 ($\Delta tar-\Delta tap$) *thr* (*Am*)-1 *leu B6 his-4 metF* (*Am*)159 *eda-50 rpsL136* (*thi-1 ara-14 lacY1 mtl-1 xyl-5 tonA31 tsx-78*) cedida por el Dr. J S. Parkinson

E. coli RP2361 (Δtar) DEm386-2 *thr* (*Am*)-1 *leu B6 his-4 metF* (*Am*)159 *eda-50 rpsL136* (*thi-1 ara-14 lacY1 mtl-1 xyl-5 tonA31 tsx-78*) cedida por el Dr. J S.

Parkinson

E. coli RP5700 (Δtsr) DE7028-2 *thr* (*Am*)-1 *leu B6 his-4 metF* (*Am*)159 *eda-50 rpsL136* (*thi-1 ara-14 lacY1 mtl-1 xyl-5 tonA31 tsx-78*) cedida por el Dr. J S.

Parkinson

3.2. Medios de cultivo

3.2.1. Agar Luria Bertani

Bacto Triptona	10 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	15 g/L

3.2.2. Caldo Luria Bertani

Bacto Triptona	10 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	5 g/L

3.2.3. Agar Soya Triptona (TSA).

Agar TSA	36 g/L
Suero de caballo	45 mL/L
Isovitalex	3 mL/L
Dent	4 mL/L

3.3. Antibióticos.

Ampicilina	100 µg/mL	<i>E. coli</i>
Cloramfenicol	100 µg/mL	<i>E. coli</i>
	20 µg/mL	<i>H. pylori</i>
Kanamicina	30 µg/mL	<i>E. coli</i>

Estos antibióticos se prepararon como soluciones acuosas y se esterilizaron mediante filtración en filtros Millipore de 0,22 µm.

3.4. Reactivos

Los reactivos usados se obtuvieron de los siguientes proveedores:

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

Bio-Rad Laboratories Inc., Melville, N Y, USA: azul de bromofenol.

Gibco BRL, Maryland, USA: agarosa, extracto de levadura, Tris base, peptona 140, kanamicina sulfato, urea, EDTA, glicina, kanamicina, suero de caballo, endonucleasa de restricción (*Pst*I), fosfatasa alcalina (CIAP), polinucleótido kinasa del fago T4, DNA ligasa del fago T4, marcador de tamaño de DNA 1 kb, oligonucleótidos.

Sigma Chemicals Co. , St Louis, USA: bromuro de etidio, L- arginina, L- aspartato, L- serina, L-leucina, L-alanina, L- valina, L-cisteína

Winkler Ltda: cloruro de magnesio, 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, bicarbonato de sodio.

Oxoid, England: Campygen, suplemento antibiótico Dent.

Difco Lab, USA: agar granulado.

Promega Life Sciences, Inc, USA: dNTPs, Taq DNA polimerasa, kit de purificación de plasmidio "Wizard Plus Maxiprep", IPTG, X-gal, *Bam*HI, *Sac*I, *Xho*I.

New England Biolabs: Inc., Beverly MA., USA: *Nde*I, *Eco*RI.

Laboratorio Chile S.A.: ampicilina, cloramfenicol.

FMC BioProducts: agarosa de bajo punto de fusión NuSieve® GTG®.

3.5. Plasmidios

Se utilizó como vector de clonamiento el plasmidio pUC19 de New England Biolabs Inc. En el desarrollo del mutante por inserción se empleó el plasmidio pBR322 de New England Biolabs Inc.

Como vector de expresión se empleó el plásmido pET21a de Novagen, asistido por el vector pGP1-2, cedido por el Dr. A. Venegas, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

El 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 Departament of Molecular Microbiology, School of Medicine, University of Washington, St Louis, E.E.U.U.

3.6. Partidores

Los partidores empleados en la amplificación mediante PCR de los ORF HP0082, HP0099 y HP0103 de *H. pylori*, fueron:

HP00825: 5' ATG AAA TCT ACA AGA ATT GG 3'

HP00823: 5' TTC TTT TAA GGT AAT AGA GG 3'

HP103N5: 5' CCG CAT ATG ATG TTT TCT TCA ATG TTT GC 3'

HP103B3: 5' CCG GGA TCC ATT AAA ACA CGC CGT GAT CAC 3'

Los partidores empleados en la amplificación del ORF HP0099 de *H. pylori*, fueron:

HP-995: 5' CGA TTG GAC GTC TTT TTA ATC C 3'

HP-993: 5' CCC GCA AAA GCT TCT TTA GC 3'

Los partidores usados en la inserción de los sitios de restricción de las enzimas *NdeI* y *BamHI* en los extremos 5' y 3' del ORF HP0099, respectivamente, fueron:

HP99N5: 5' CCC CAT ATG TTG TCT AAA GGT TTG AGT ATC GG 3'

HP99X3: 5' CCC CTC GAG TAA TCG CCC TCG AGC AAT TC 3'

4. MÉTODOS

4.1. Almacenamiento y cultivo de las cepas bacterianas.

Las cepas de *H. pylori* se cultivaron sobre placas TSA, suplementadas con 5% de suero de caballo, suplemento nutritivo Isovitalax y el suplemento selectivo Dent, en un incubador de atmósfera controlada a 5,5% v/v CO₂ y 80% de 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). Luego de 48 h de crecimiento, una masa de bacterias equivalente a un cuarto de placa se cosechó con un asa metálica estéril y suspendió homogéneamente en 1 mL de amortiguador 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% v/v de glicerol para ser almacenadas a -80°C.

Las cepas de *E. coli* transformadas y no transformadas se crecieron 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.

4.2. Preparación de DNA cromosomal de *H. pylori*.

El DNA cromosomal de *H. pylori* se purificó según el método descrito por Clayton y Mobley (1997). Básicamente, células de *H. pylori* crecidas en una placa TSA durante 24 h se suspendieron en 900 μ L de amortiguador 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 μ L de amortiguador TE. Luego, se adicionó 30 μ L de SDS al 10% y 3 μ L de Proteínasa 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 μ L de NaCl 5M y 80 μ L de solución CTAB/NaCl (4,1 g de NaCl y 10 g de CTAB para 100 mL de solución) y se incubó por 10 min 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.

4.3. Preparación de 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.

4.4. Amplificación de los ORFs HP0082, HP0099 y HP0103 de *H. pylori* 26695 y 43504 mediante PCR.

La reacción de amplificación para cada uno de los posibles genes *mcp* se realizó en un volumen final de 20 μ L en solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM, 2,5 mM de cada desoxirribonucleósido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), partidores a una concentración final de 1 μ M, 0,2 unidades de *Taq* polimerasa, 0,1 ó 0,5 μ g de DNA cromosomal de *H. pylori* y 1,75 mM de MgCl₂ durante 25 ciclos de amplificación en un termociclador MJ Research consistentes en 45 s a 94 °C (desnaturación), 90 s a 50 °C para *hp0082*, 55 °C para *hp0099* y 58°C para *hp0103* (hibridación) y 1 min por cada 1 kb de DNA a 72 °C (elongación), por 20 ciclos seguido por un período de 10 min adicionales a 72 °C. Al finalizar, las muestras se mantuvieron a 16 °C hasta ser analizadas en geles 1% agarosa.

4.5. Digestiones de DNA con endonucleasas de restricción.

Se incubaron entre 10 a 30 μ g de DNA con 5 a 30 U de enzima de restricción en un volumen final de 100 μ L en el correspondiente amortiguador, por 1 h a 37 °C, seguida de una etapa de inactivación de 10 min a 65 °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.

4.6. 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%).

4.7. 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 col., 1989).

4.8. 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 cortaron 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 glicógeno (20 mg/mL) por cada 50 µL de volumen de muestra. La precipitación se llevó a cabo durante 2 h a -20 °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 %.

4.9. Purificación de DNA a partir de reacciones de PCR.

Los fragmentos de DNA obtenidos a partir de amplificaciones por PCR, se purificaron con el kit "ConcertTM Rapid PCR Purification System" según las instrucciones del proveedor. Para aumentar la concentración de las muestras, el DNA se precipitó como se indicó anteriormente. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en agua estéril y se analizó una alícuota mediante electroforesis en geles de agarosa.

4.10. Obtención de extremos romos en fragmentos de DNA.

Los fragmentos de DNA de extremos cohesivos se trataron con la DNA polimerasa del fago T4 según el método descrito por Weiss y col. (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 min a 16 °C, seguida de una inactivación de 5 min a 65 °C.

4.11. Fosforilación de insertos.

Los fragmentos obtenidos mediante PCR purificados se incubaron con 2 μL de 50 mM ATP, 2 μL de amortiguador de reacción 10X (500 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM MgCl_2 , 100 mM 2- mercaptoetanol) y 40 U de polinucleótido kinasa del fago T4, en un volumen final de 20 μL . La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 37 °C, inactivándose por 10 min a 65 °C. Los fragmentos de DNA se purificaron con el kit "Wizard™ DNA Clean-Up System" de Promega, según las indicaciones del proveedor. En el caso de los fragmentos romos, a la misma mezcla obtenida del tratamiento con T4 polimerasa, se le adicionaron 2 μL de ATP 50 mM y 40 U de polinucleótido kinasa del fago T4 y sometida a las mismas condiciones señaladas para extremos cohesivos.

4.12. 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), MgCl_2 1 mM, ZnCl_2 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 se inactivó por 15 min a 56 °C. A continuación, 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 "Wizard™ DNA Clean-Up System" de Promega.

4.13. 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 20 µL en una relación molar inserto:vector 3:1 para extremos cohesivos y de 6:1 en el caso de extremos romos. Luego, se adicionaron 2 µL de solución amortiguadora para ligación 10X (Tris-HCl 300 mM, pH 7,8; MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM), 2 µL de ATP 500 µM, 2 µL PEG al 20%, 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 e inactivaron por 10 min a 65 °C.

4.14. Preparación de células electrocompetentes.

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

4.15. Transformación bacteriana con DNA plasmidial

4.15.1. Transformación natural de *H. pylori*.

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 en esas condiciones y el precipitado se resuspendió en 200 µL de glicerol frío al 10 % v/v 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 una placa TSA e incubó en ambiente de microaerofilia a 37 °C durante 12 h. Después de este período, las células cosechadas se resuspendieron en PBS. 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 9 días, hasta la aparición de colonias. Éstas se amplificaron en placas con las mismas condiciones y una vez crecidas se purificó su DNA cromosómico, el que se analizó por PCR.

4.15.2. Electrotransformación de *E. coli*.

La electrotransformación de las cepas de *E. coli* se realizó según el método descrito por Chasy y col. (1988), 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" a 400 V, 4 M Ω y 330 μF . Luego de aplicar el pulso se retiró la cubeta de la cámara, colocándose inmediatamente en hielo y las células se diluyeron con 800 μL de caldo LB estéril. Después de incubar las células por 1 h a 37 °C, se sembraron alícuotas de 50, 100 y 150 μL en placas LB-agar con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloramfenicol, 100 y/o 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina de kanamicina, respectivamente según el cassette de resistencia que portara el plásmido.

4.16. Ensayo de expresión inducida.

Para estos experimentos se utilizó un sistema plasmidial dual, consistente en la transformación de las distintas cepas de *E. coli* con el plásmido pGP1-2 (kan^{R}), que contiene en su secuencia el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor P_{L} termoinducible del fago λ y el represor cI del mismo fago bajo el promotor lac . El segundo componente de este sistema es un plásmido derivado de pET21a (Amp^{R}) que contiene el marco de lectura a

expresar bajo el control del promotor T7. De esta manera, al someter a una incubación a 42 °C, se inactiva el represor cl, permitiendo la expresión de T7 pol, induciéndose los genes clonados bajo el control de este promotor.

La inoculación de los clones en estudio se hizo en 5 mL de caldo LB con 30 µg/mL de kanamicina y 100 µg/mL de ampicilina, con 20 µL de cultivo saturado crecido toda la noche a 30 °C. Los cultivos se crecieron en las mismas condiciones hasta una DO₅₆₀ de 0,4, luego de lo cual se adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM. Un set de tubos se incubó a 42 °C durante 30 min, seguido por un período de recuperación de 30 min a 30 °C mientras que el otro siguió a 30 °C por 1 h.

4.17. Ensayo de quimiotaxis.

El ensayo de quimiotaxis se llevó a cabo empleando el método descrito por Mazunder y col. (1999). Este consiste en la preparación de células de *H. pylori* o de *E. coli* crecidas en placas de agar sangre o caldo LB, respectivamente, las que se resuspendieron y lavaron 2 veces en amortiguador de quimiotaxis (fosfato de potasio 10 mM, pH 7). Posteriormente, se preparó una suspensión de bacterias a una concentración de 3×10^8 células/mL. Cien µL de esta suspensión de bacterias fue puesta en una punta de micropipeta de 200 µL y se ajustó en una jeringa insulínica de 1 mL, cuya aguja representa un capilar que contiene 100 µL de la solución del compuesto a estudiar en una concentración

de 10 mM, amortiguador de quimiotaxis y 3% p/v PVP, salvo excepciones. Este sistema se incubó 45 min a 30 °C. Después de este período, la punta con la suspensión de bacterias es retirada y el contenido de la jeringa es sembrado en placas de agar suero o LB agar en diluciones seriadas de 10, para determinar el número de bacterias que ingresó a la jeringa. Las placas se incubaron en un incubador de atmósfera controlada a 5,5 % v/v CO₂ y 80 % de humedad a 37 °C durante 4 días hasta obtener colonias que se pudieran contar.

Se define un compuesto como un atrayente cuando la **Respuesta Quimiotáctica Relativa (RCR)**, que corresponde a la razón entre las unidades formadoras de colonias (UFCs) obtenidas en presencia de un agente químico y las UFCs obtenidas sólo en presencia del amortiguador de quimiotaxis, es igual o mayor que dos (Mazunder y col, 1999).

4.18. Experimentos de movilidad.

El ensayo de movilidad se llevó a cabo en placas agar al 0,3 %, suplementadas con suero, Isovitalex y Dent. Estas placas se inocularon con un estilete metálico sumergidos en una suspensión de 3×10^8 células/mL de *H. pylori*. Estas placas se incubaron por 4 días en un incubador de atmósfera controlada a 5,5 % v/v CO₂ y 80 % de humedad a 37 °C.

4.19. Análisis estadístico.

Los datos representan el valor promedio de al menos cinco experimentos independientes y se analizaron mediante el test estadístico t de Student en los resultados que se mencionen.

5. RESULTADOS

5.1. Experimentos de movilidad en agar blando.

Con el propósito de ensayar la capacidad de nado de *H. pylori*, se ensayaron las cepas 43504 y 26695 empleadas en este estudio. La capacidad de natación se ensayó en placas de TSA suero con agar 0,3%, inoculando éstas con un estilete sumergido en suspensiones de 3×10^8 células/mL de cada cepa. Ambas cepas formaron halos concéntricos, deduciéndose que son móviles, por lo que las posibles alteraciones en el patrón de respuesta quimiotáctica en alguna de éstas no estarían dadas por alteraciones en su capacidad de nadar (Figura 5).

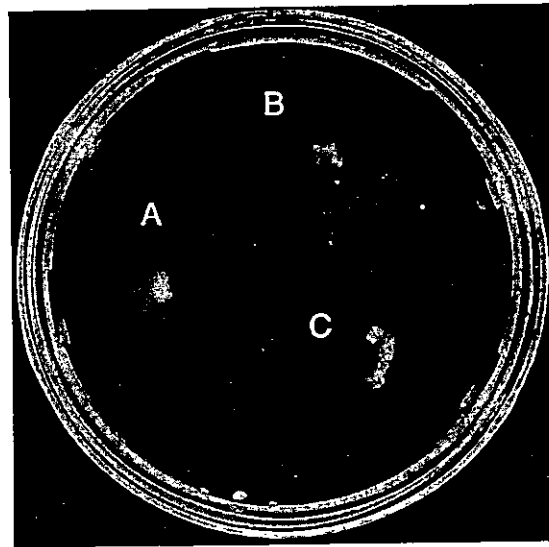


Figura 5. *H. pylori* 26695, 43504 y OC695 son móviles. Se sembraron suspensiones celulares de las cepas 26695 (A), 43504 (B) y OC695 (C) en placas de medio TSA, 0,3% de agar, las que se incubaron por 5 días a 37 °C, 5,5 %v/v CO₂ y 80% de humedad. En el caso de todas las cepas, se aprecia la formación de un halo concéntrico al sector de siembra, que confirma la movilidad de éstas.

5.2. Quimiotaxis en *H. pylori*.

En *H. pylori* el ión Ni²⁺ juega un rol fisiológico importante, debido a que participa como cofactor de la enzima ureasa (Sachs y col, 2003). Esta enzima está involucrada en la neutralización del bajo pH al que la bacteria es enfrentada en el estómago mediante la hidrólisis de urea en NH₃ y CO₂ (Sachs y col, 2003). Ante estos antecedentes y sabiendo que la concentración disponible de Ni²⁺ en el estómago es baja, se ensayó el comportamiento quimiotáctico frente a NiCl₂ a concentraciones inferiores a 500 µM con las cepas 26695 y 43504, debido que

concentraciones superiores de este ión son tóxicas para la bacteria, encontrándose que para ambas cepas, Ni^{2+} no constituye un quimioefector, pudiendo ser un repelente (Figura 6A.).

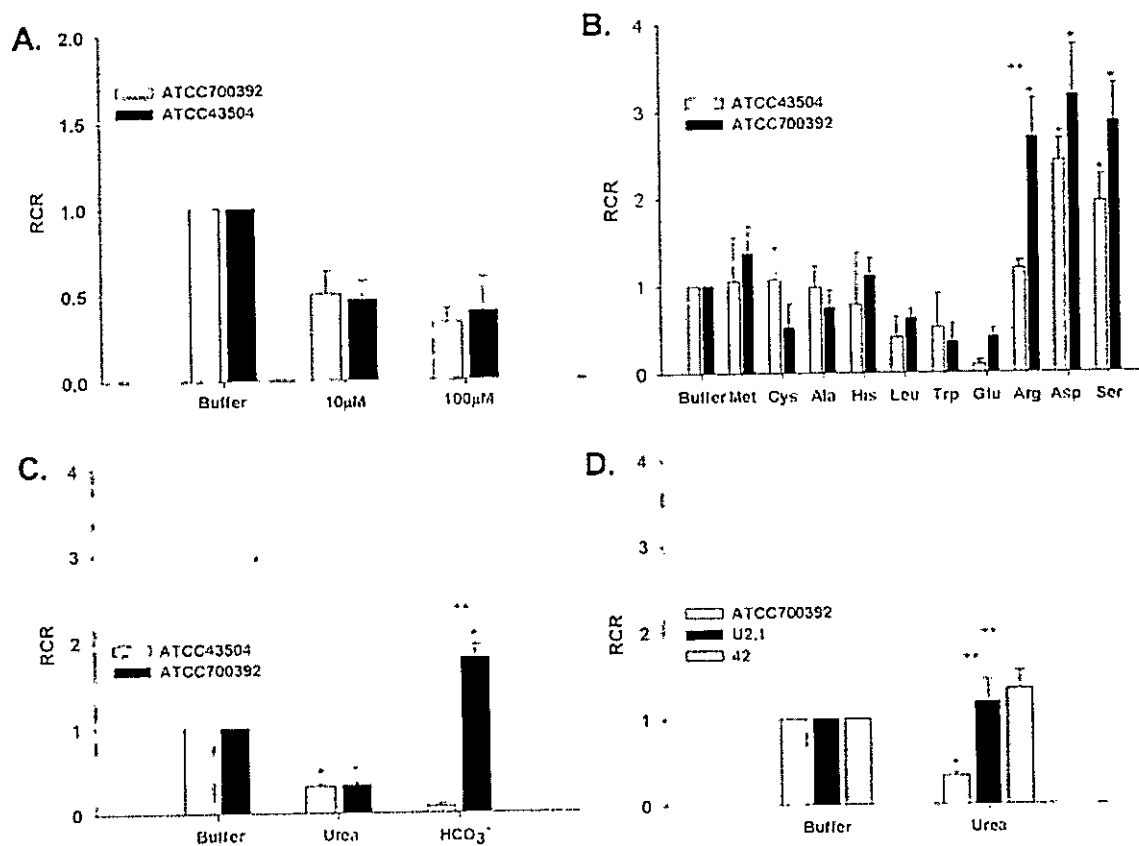


Figura 6. *H. pylori* es atraída por aspartato, serina, arginina y bicarbonato de sodio, pero no por Ni^{2+} . Se estudió la respuesta quimiotáctica, representada como RCR, NiCl_2 (10 μM y 100 μM) (A.); a aminoácidos como metionina, cisteína alanina, histidina, leucina, arginina, aspartato, serina (10 mM) (B.) y a compuestos como urea y bicarbonato de sodio (10 mM) (C.) para las cepas 26695 y 43504 y a urea 10 mM para las cepas U2.1 y 42, mediante el ensayo del capilar modificado según el protocolo señalado en la sección Materiales y Métodos. Cada barra corresponde al promedio de al menos 5 experimentos independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

El crecimiento de *H. pylori* en condiciones de laboratorio, requiere de la presencia de los 20 aminoácidos. Por otra parte, de la reconstitución genómica del metabolismo de *H. pylori* (Schilling y col., 2002), se sabe que existen al menos ocho aminoácidos que serían requeridos para el crecimiento de la bacteria que son alanina, arginina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, valina y cisteína en ausencia de sulfato como fuente de azufre. En virtud de estos antecedentes, se ensayó la respuesta quimiotáctica de las cepas 43504 y 26695 frente a estos aminoácidos, además de aspartato y serina como modelos de estudio, en virtud al amplio conocimiento acumulado en los modelos *E. coli* y *S. typhimurium* en los receptores Tar y Tsr, que reconocen a estos aminoácidos como atrayentes, respectivamente.

Ninguno de los aminoácidos ensayados resultaron ser atrayentes en ambas cepas, excepto L-serina, L-aspartato y L-arginina, frente a la que se encontró una respuesta distinta entre ambas cepas: mientras la cepa 43504 no fue capaz de sensar arginina, 26695 mostró respuesta quimiotáctica (Figura 6B.).

Urea y bicarbonato juegan una importante función en la sobrevivencia y persistencia de *H. pylori* en el estómago, por su relación en la neutralización del pH ácido del medio (Sachs y col, 2003). Mizote y col. (1997), describieron que *H. pylori* CPY3401 era atraída hacia gradientes de urea y bicarbonato de sodio.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se realizaron ensayos de quimiotaxis con las cepas antes mencionadas frente a estos compuestos, los que indicaron que ninguna de las cepas ensayadas reconocieron urea como un atrayente, en desacuerdo a lo que Mizote y col (1997) informaron (Figura 6C.). Los ensayos frente a urea se repitieron con concentraciones entre 500 μ M y 1 mM y a pH 5,5 y 6, los que dieron resultados similares (datos no mostrados). Por otra parte, se sabe que existe un alto porcentaje de ureasa presente en la pared de *H. pylori*, la que podría evitar el ingreso de urea al periplasma en concentraciones detectables para el receptor. Para corroborar esta hipótesis, se ensayó la respuesta quimiotáctica a urea en las cepas U2.1 y 42, las que carecen de actividad ureasa (Figura 6D.). Los experimentos con estas cepas corroboraron los resultados anteriores, aunque con una respuesta quimiotáctica a urea mayor a la de las cepas 43504 y 26695. Los ensayos de quimiotaxis frente a bicarbonato de sodio, mostraron que la cepa 43504 no fue atraída por este compuesto, mientras que para la cepa 26695 resultó ser un atrayente, comportamiento similar al hallado frente a arginina (Figura 6C.).

Con el objetivo de comprender las diferencias entre las respuestas quimiotácticas de estas cepas frente a L-arginina y bicarbonato de sodio como quimioefectores, se apuntó a la posibilidad de la existencia de diferencias de origen genético entre las cepas estudiadas a nivel de las hipotéticas MCPs que dieran cuenta de estas diferencias fenotípicas.

5.3. Amplificación de los genes *hp0082*, *hp0099* y *hp0103*.

Con el objetivo de comprender el fundamento genético de la diferencia de las respuestas quimiotácticas frente a bicarbonato y arginina entre ambas cepas, se planteó el estudio de los genes *hp0082*, *hp0099*, y *hp0103* de *H. pylori*, que corresponden a genes ortólogos a *tlpA* y *tlpB* y *tlpC* de *B. subtilis*, respectivamente y que codificarían para tres de las cuatro MCPs presentes en el genoma de *H. pylori* (Tomb y col., 1997). Estos genes se amplificaron mediante la técnica de PCR a partir de DNA cromosómico purificado de las cepas 26695 y 43504. Las amplificaciones de los genes *hp0082* y *hp0103* no arrojaron diferencias entre ambas cepas, correspondiendo a los tamaños esperados de 2 kb y 1,6 kb, respectivamente (Figura 7). Sin embargo, al comparar los amplificados del gen *hp0099* de ambas cepas, se encontró que el producto obtenido a partir del DNA de la cepa 43504 migraba a un tamaño de 2,3 kb, que corresponde a un tamaño aproximadamente 300 pb mayor de lo esperado y que el amplificado de la cepa ATCC 700392 (Figura 7).

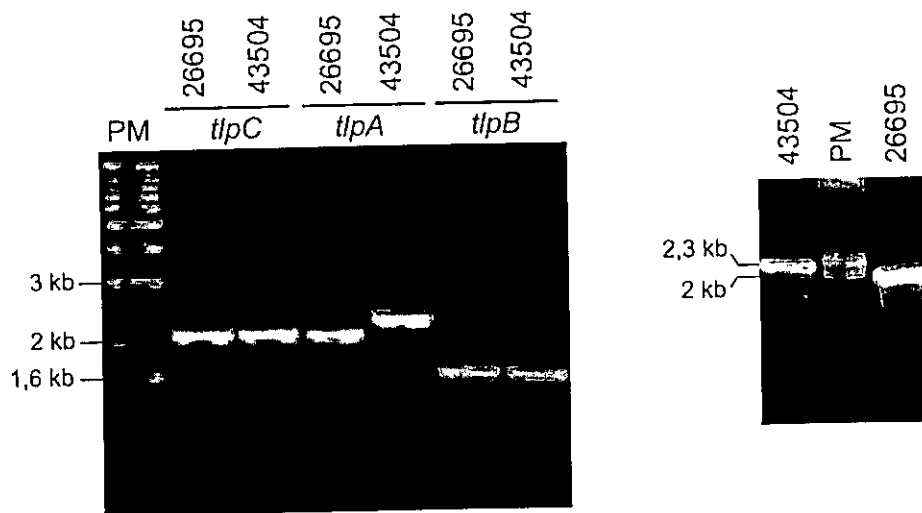


Figura 7. Amplificación mediante PCR de los genes *hp0082* (*tlpC*), *hp0099* (*tlpA*) y *hp0103* (*tlpB*) a partir de DNA genómico de las cepas 43504 y 26695 de *H. pylori*. El inserto (derecha) muestra en mayor detalle la diferencia de tamaño de los amplificadores del gen *hp0099* de las cepas 43504 y 26695.

5.4. Clonamiento del gen *hp0099*.

Una vez obtenidos los productos de PCR, estas amplificaciones se clonaron para su posterior análisis. A los productos de las amplificaciones de los genes *hp0099* a partir de las cepas 43504 y 26695 se les generó extremos romos, se fosforilaron y clonaron en el sitio *Sma*I del vector pUC19, dando origen a los plasmidios pHP699 y pHP99, respectivamente, los que se emplearon para transformar *E. coli* DH5 α mediante electroporación, cuyas transformantes fueron seleccionadas en medio LB agar suplementado con amp

y chequeadas por PCR con los partidores correspondientes para cada gen, obteniéndose amplificaciones con los tamaños esperados.

5.5. Secuenciación de *hp0099*.

Los genes *hp0099* clonados de las cepas 43504 y ATCC 700392, se secuenciaron automáticamente según el método de Sanger (Sanger y col., 1977). La secuencia obtenida del gen *hp0099* clonado a partir del DNA cromosómico de la cepa 26695 fue idéntica a la publicada por Tomb y col. (1997). En cambio, la secuenciación del gen *hp0099* clonado a partir de la cepa 43504, arrojó que éste contiene una secuencia de 371 pb inserta en el gen, a partir de la posición 318 del gen con respecto a la secuencia de la cepa 26695.

La secuencia que interrumpe este marco de lectura abierto, se analizó mediante el uso del programa BLAST, arrojando que corresponde a una pequeña secuencia de inserción específica de *H. pylori* denominada mini-IS605 y que está flanqueada por extremos de 49 pb y 41 pb. El extremo izquierdo de la mini IS605 Elemento en HP0099 es idéntica a la los elementos IS605 (GenBank AC000108) (Akopyants y col., 1998) y el extremo derecho comparte 83% de identidad con un elemento mini IS605 descrito por Censini y col. (1996) (Figura 8A.). Por otra parte, la secuencia interna de este elemento de inserción mostró porcentajes de identidad significativos con secuencias de los genes *rdxA* (99%), *vacA* (91%), y *cagl* (91%) (Figura 8B.).

Estos resultados apoyaron la hipótesis de la diferencia genética entre las MCPs de estas cepas como causa de sus distintas respuestas quimiotácticas, por lo que la cepa 43504 se constituyó en un sistema mutante natural para el estudio de la quimiotaxis en *H. pylori*.

A

Extremo derecho de IS605

```

AGCAGAAATCCCAAATATCTTTAGTGTGGGATGAATGCT
*****
AGCAGAAATCCCAAACATCTTTAGTGTGGGATGAATGCTGCTAATTTGTAGTATAATATCTCCA
TACATTTGTATCTAGCGTAGGAAGTACGCAAAGTTACGCCTTTGGAGATATGATGTGTGAGACCTG
TAGGGAATGCGTTGGAGATCAAACCTCTGTAATAATCCCTATGATTAGGGACACAAAGTGAAAACCA
ACTTTCCCTATGGGCAACATCAGCCGAGGAAGCCCAATCG-CTTTAGCGTTGGG
*****
GCAACATCAGCCTAGGAAGCCCAATCGTCTTTAGCGGTTGGG

```

Extremo izquierdo de IS605

B

tlpA	GCTAATTTGT	AGTATAATAT	CTCCATACAT	TTGTATCTAG	CGTAGGAAGT	ACGCAAAGTT	ACGCCTTTGG
rdxA	GCTAATTTGT	AGTATAATAT	CTCCATACAT	TTGTATCTAG	CGTAGGAAGT	ACGCAAAGTT	ACGCCTTTGG
vacA	-CTAATTTGT	AGTATAATAT	CTCCATACAT	TTGTATCTAG	TCCAGGAAGT	GCACAAAG--	---CGCTTTGG
cagI	---AATTCAG	GGTATCATA	CCCATACAT	TCGTATCTAG	CGTAGGAAGT	GTCAAAGTT	ACGCCTTTGG
tlpA	AGATATGATG	TGTGAGACCT	GTAGGGAATG	CGTTGGAGAT	CAAACCTCTGT	AAAATCCCTA	TGATTAGGGA
rdxA	AGATATGATG	TGTGAGACCT	GTAGGGAATG	CGTTGGAGAT	CAAACCTCTGT	AAAATCCCTA	TGATTAGGGA
vacA	AGATATGATG	TGTGAGACCT	GTAGGGAATG	CGTTGGAGAT	CAAACCTCTGT	AAAATCCCTA	TGATTAGGGA
cagI	AGATATGATG	TGTGAGACCT	GTAGGGAATG	CGTTGGAGCT	CAAACCTCTGT	AAAATCCCTA	TTA-TAGGGA
tlpA	CACAAAGTGA	AAACCAAAC	TTCCCTATGGG				
rdxA	CACAAAGTGA	AAACCAAAC	TTCCCTATGGG	(99%)			
vacA	CACAAAGCCA	AAACCAAAC	CTCCCTACGG-	(91%)			
cagI	CACAAGTGA	AAACCAAAC	CTCCCTACGGG	(91%)			

Figura 8. Elemento de inserción mini-IS605 encontrado en el marco de lectura abierto HP0099 de la cepa 43504 de *H. pylori*. A. Alineamiento de la secuencia del elemento mini-IS605 de HP0099 de *H. pylori* cepa 43504 con las secuencias de los extremos izquierdo y derecho del elemento IS605. Los asteriscos indican identidad entre ambas secuencias. B. Alineamiento de la secuencia interna del elemento de inserción mini-IS605 de HP0099 con las de los genes *cagI*, *vacA* y *rdxA*.

5.6. Construcción de mutante "knock out" *hp0099*.

Con el objetivo de comprobar que el fenotipo presentado por la cepa 43504 frente a L-arginina y bicarbonato de sodio se debe a la interrupción del gen *hp0099* por la mini IS605, la que suprimiría la expresión del receptor, se diseñó un mutante isogénico a 26695. Para esto, se subclonó el gen *hp0099* en el sitio *Bam*HI del plásmido pBR322. Posteriormente, este constructo, denominado pBR99, se digirió con *Sac*I, que corta en la posición 1603 de *hp0099*. En esta posición se insertó un cassette de 1013 pb, que codifica para la enzima cloramfenicol acetil transferasa (CAT), procedente de *Campylobacter coli* (Wang y Taylor, 1990), que interrumpe el gen y confiere resistencia a este antibiótico, dando origen al plásmido pBR99::*cat*, con el que se transformó la cepa *E. coli* DH5 α mediante electroporación. Las colonias seleccionadas en medio LB agar suplementado con amp y cam a las concentraciones indicadas previamente, se analizaron por PCR, obteniéndose un fragmento amplificado de aproximadamente 3.000 pb, en las colonias que llevaban la construcción, que corresponde a la suma de los tamaños de los genes *hp0099* (2.025 pb) y *cat*, concluyéndose una inserción efectiva del cassette. A partir de una colonia positiva, se purificó su DNA plasmidial, el que se incubó con un cultivo confluyente de *H. pylori* 26695. Este cultivo se traspasó a placas agar suero suplementadas con cloramfenicol y se incubaron en las condiciones típicas de crecimiento por 5 días, después de los cuales se purificó el DNA cromosómico de colonias individuales y se analizó mediante PCR, con los partidores HP-995 y

HP-993, permitiendo la obtención de la banda esperada de 3.000 pb (Figura 9). La nueva cepa que lleva el gen *hp0099* anulado, denominada OC695, se creció en placas agar suero suplementadas con cloramfenicol y se resuspendieron en medio TSB con glicerol 10% para guardarlas a -80°C .

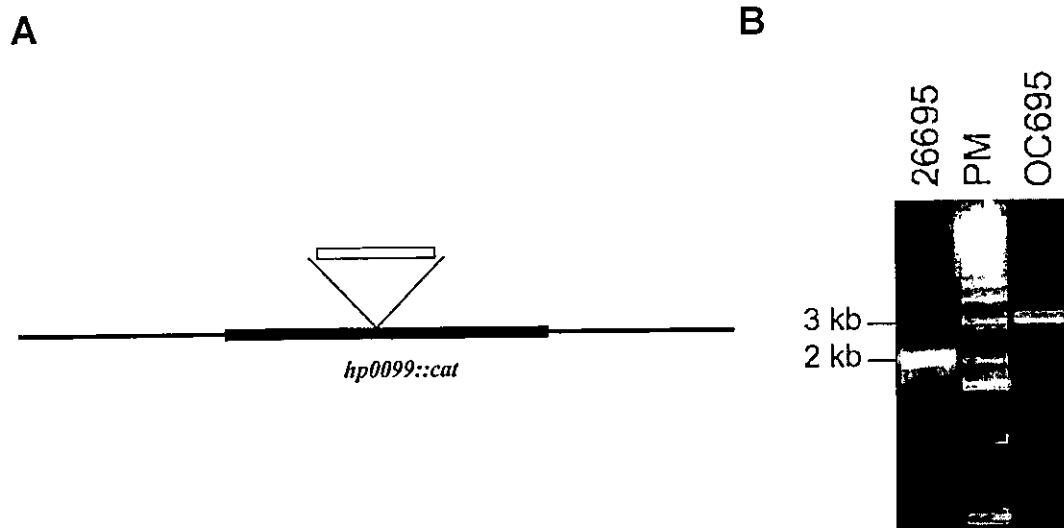


Figura 9. Construcción de mutante *H. pylori* OC695 (*hp0099::cat*). A. Esquema del producto de la inserción del cassette CAT a nivel cromosómico en el gen *hp0099* en *H. pylori* 26695. B. Amplificación mediante PCR que confirma la inserción de CAT en *hp0099* en la cepa OC695.

5.7. Movilidad en *H. pylori* OC695.

Una vez obtenida la cepa OC695, isogénica a la cepa 26695, se ensayó su capacidad móvil con el propósito de comprobar si la mutación producida tuvo un efecto polar, en particular en la capacidad de movimiento de la bacteria. Para esto, se ensayó de igual forma que las cepas ATCC 43504 y ATCC 700392 su movilidad en placas con 0,3% agar suplementadas con suero. Este experimento demostró que la mutación en el gen *hp0099* no altera la movilidad de las bacterias en medio rico (Figura 5C).

5.8. Quimiotaxis en *H. pylori* OC695.

Una vez demostrado el fenotipo móvil en la cepa OC695, se ensayó la respuesta quimiotáctica frente a urea, bicarbonato de sodio y L-arginina, de la misma forma empleada para las cepas anteriores. Los resultados obtenidos muestran que esta cepa presenta un fenotipo similar a la cepa 43504 cuando se ensaya frente a arginina y Na_2HCO_3 , presentando ausencia en la capacidad de sensor ambos compuestos (Figura 10). En el experimento frente a urea como quimioefector, la ausencia de atracción aumenta en comparación a la cepa parental 26695. Estos resultados llevan concluir que el ORF HP0099 codificaría para un receptor quimiotáctico que reconoce arginina y bicarbonato en *H. pylori*.

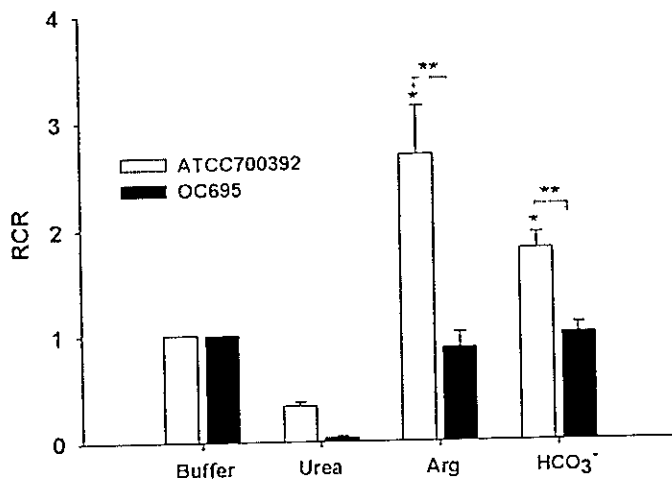


Figura 10. La mutación en el gen *hp0099* anula la capacidad de sensar arginina y bicarbonato de sodio en *H. pylori*. La figura muestra la respuesta quimiotáctica para las cepas 26695 (barras blancas) y OC695 (barras negras), representada como RCR, mediante el ensayo del capilar modificado. Las propiedades quimiotácticas de la cepa OC695 difieren en comparación a su parental isogénica. Cada experimento fue repetido al menos 5 veces (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.9. Complementación en mutantes *mcp* de *E. coli*.

Los ensayos de quimiotaxis en *H. pylori* 43504 y 26695, apoyaron la hipótesis de la diferencia genética entre ambas cepas como el fundamento de sus diferencias en la respuesta quimiotáctica. Con el fin de confirmar dicha conclusión, se llevaron a cabo ensayos de quimiotaxis en cepas de *E. coli* defectuosas en distintas MCPs transformadas con vectores de expresión con el gen *hp0099* de las cepas ATCC43504 y 700392. Con estos constructos, se

transformaron cultivos electrocompetentes de las cepas RP4372 ($\Delta tar-tap$), RP5700 (Δtsr) y RP2361 (Δtar) de *E. coli* mediante electroporación, las que previamente se habían transformado con el plasmidio pGP1-2 por la misma técnica. Estos cultivos se crecieron en medio líquido LB suplementados con Kan y Amp (en las concentraciones indicadas en la sección Materiales y Métodos) y posteriormente fueron guardados en glicerol 10% a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una vez obtenidas las cepas transformadas con los plasmidios pGP1-2 y pHA99 y pHA699, se creció un cultivo de las cepas transformantes pGP1-2/pHA99, pGP1-2/pHA699 y pGP1-2/pET21a en medio LB líquido suplementado con kan y amp a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche. De este cultivo se tomó una alícuota de $50\text{ }\mu\text{L}$ y se sembraron 2 tubos con 5 mL de medio LB líquido suplementados con kan y amp por cada transformante. Estas células se crecieron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que alcanzaron una DO_{560} aproximada de $0,4\text{ U/mL}$ (equivalentes a 3×10^8 células/mL). Uno de estos tubos se incubó en un baño termorregulado a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un período de 30 min , después del cual las células se recuperaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min . Como control, el tubo restante se sometió a una incubación a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h .

5.10. Quimiotaxis en transformantes de *E. coli*.

Con el objetivo de verificar si la expresión del gen *hp0099* en las cepas RP4372 ($\Delta tar-tap$), RP5700 (Δtsr) y RP2361 (Δtar) de *E. coli*, era capaz de complementar sus respectivas mutaciones o conferir nuevas propiedades quimiotácticas, se ensayó la quimiotaxis para estas cepas en presencia y ausencia de la inducción de la expresión de *hp0099*. Para ello, se crecieron cultivos de estas cepas en caldo LB suplementado con amp y kan a 37 °C hasta que alcanzaron una DO₅₆₀ aproximada de 0,4 U/mL. Uno de estos tubos se incubó en un baño termostático a 42 °C por un período de 30 min, después del cual las células se recuperaron a 30 °C por 30 min y el cultivo control se incubó a 30 °C por 1 h. Después de este tratamiento, estas células se lavaron dos veces en amortiguador de quimiotaxis, se resuspendieron en el mismo y se ensayó su respuesta quimiotáctica frente a urea, bicarbonato de sodio, arginina, serina y aspartato, mediante el ensayo del capilar modificado. Como experimento control, se incluyó la cepa RP4372 transformada con los plasmidios pGP1-2 y pET21a, con el objeto de demostrar que la inclusión de éstos sin inserto no altera el comportamiento quimiotáctico de las bacterias (Figura 11A). Cuando se ensayó la respuesta quimiotáctica para la cepa RP4372 (pGP1-2/pHA699) en ausencia y presencia de inducción, no mostró capacidad de atracción hacia ninguno de los compuestos ensayados (Figura 11B). Sin embargo, al transformar esta cepa con los vectores pGP1-2 y pHA99 e inducirse

la expresión de *hp0099* mediante su incubación a 42 °C, ésta mostró respuesta quimiotáctica hacia urea, bicarbonato y arginina (Figura 11C). Se obtuvieron resultados similares a éstos bajo condiciones de inducción del gen *hp0099*, cuando se transformaron con este sistema a las cepas RP5700 (Figura 11D) y RP2361 (Figura 11E). La expresión de este gen fue incapaz de complementar las respectivas mutaciones en las cepas transformadas. Estos resultados demuestran que el ORF HP0099, codifica para una proteína quimiotáctica que reconoce arginina, bicarbonato de sodio y urea en *E. coli*.

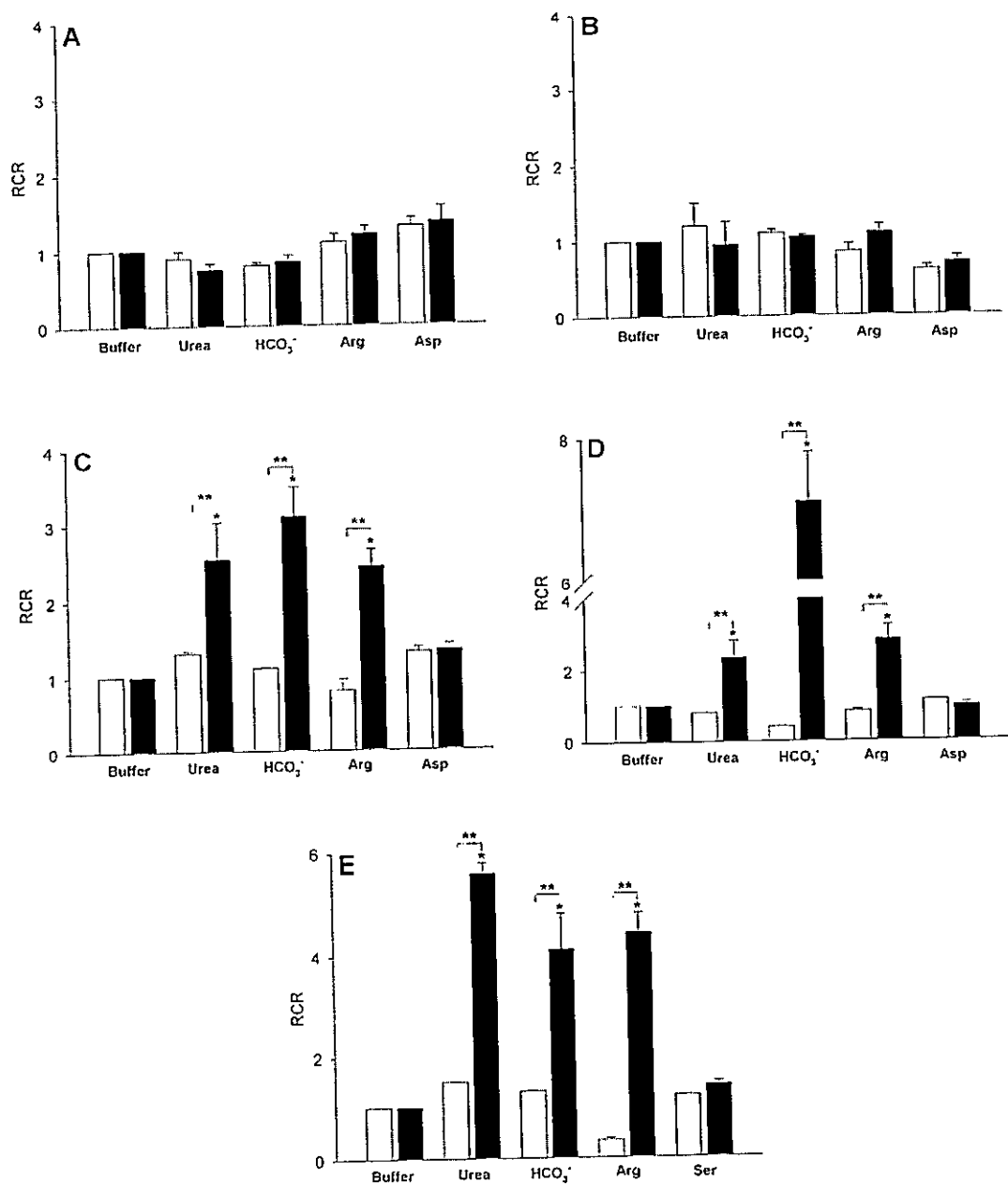


Figura 11. La expresión del gen *hp0099* confiere la capacidad de sensar arginina, bicarbonato de sodio y urea a *E. coli*. La figura muestra la respuesta quimiotáctica, representada como RCR, de *E. coli* llevando los plásmidos pGP1-2 y pET21a, con el gen *hp0099* activo e inactivo, hacia urea, bicarbonato de sodio, arginina, serina y aspartato. Las barras blancas representan las células tratadas a 30 °C y las barras negras a las sometidas a inducción a 42 °C. Cada barra corresponde al promedio de al menos 5 experimentos independientes. A. RP4372 ($\Delta tar-\Delta tap$)

transformada con los plasmidios pGP1-2 y pET21a. B. RP4372 transformada con los plasmidios pGP1-2 y pHA699. C. RP4372 transformada con los plasmidios pGP1-2 y pHA99. D. RP2361 (Δtar) transformada con pGP1-2 y pHA99. E. RP5700(Δtsr) transformada con pGP1-2 y pHA99. Cada experimento fue repetido al menos 5 veces (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

6. DISCUSIÓN

La colonización del estómago por *H. pylori* es promovida por los factores involucrados en la movilidad y quimiotaxis. Eaton y col. (1996) determinaron que cepas mutantes no móviles de *H. pylori* para las proteínas constituyentes del flagelo, FlaA y FlaB, persistían menos tiempo que sus respectivas cepas parentales en cerdos gnotobióticos. Por otra parte, Andermann y col. (2002) demostraron que cepas de *H. pylori* deficientes en los genes *tlpA* y *tlpC*, pueden colonizar ratones gnotobióticos tan eficientemente como la cepa silvestre, pero son incapaces de competir con sus respectivas parentales en condiciones de coinfección en este mismo modelo. Esto nos lleva a la conclusión que los genes involucrados en los procesos de movilidad y receptores quimiotácticos participarían en la colonización del estómago por esta bacteria.

En este trabajo se ha demostrado que *H. pylori* cepa 26695 reconoce aspartato, serina, arginina y bicarbonato de sodio como atrayentes, siendo estos dos últimos sensados mediante el receptor TlpA, codificado por el ORF HP0099 y posiblemente Ni^{2+} y urea como repelentes. Por otra parte, hemos validado estos resultados en *H. pylori* cepas 43504 y OC695, que contienen una inserción de un elemento mini-IS605 y un cassette Cam^R en el gen *tlpA*, respectivamente, siendo incapaces de reconocer arginina y bicarbonato de sodio como atrayentes y mediante experimentos de expresión heteróloga del ORF HP0099 en *E. coli*.

En la capa mucosa que recubre el epitelio gástrico existe un gradiente de concentración de urea, lo que permitiría a *H. pylori* sensor concentraciones mayores de este compuesto, permitiendo la evasión del estrés ácido de manera dependiente de ureasa (Toledo y col, 2002). En discordancia a lo reportado por Mizote y col (1997), quienes describieron que *H. pylori* CPY3401 responde a urea y bicarbonato como atractantes, nuestros experimentos mostraron ausencia de atracción hacia urea en ambas cepas de *H. pylori* ensayadas, lo que también fue encontrado por Andermann y col (2002). Una posible explicación para estas diferencias, se debería a la alta variabilidad genética encontrada entre distintas cepas de *H. pylori* (Akopyants y col., 1992) lo que daría una expresión diferenciada del receptor entre éstas.

Nuestros resultados mostraron la ausencia de quimioatracción en presencia de Ni^{2+} para *H. pylori*. Si bien la cantidad de bacterias que ingresaron al capilar disminuye a medida que aumenta la concentración del ión, lo que sugeriría que Ni^{2+} podría constituir un repelente, el método en si limita tal conclusión, puesto que esta disminución en el número de UFCs podría deberse a la misma toxicidad generada por el ión incorporado y acumulado por las células durante el período de incubación, o bien a la inhibición del motor flagelar, aunque no se descarta la posibilidad que este ión sea un repelente efectivamente.

La expresión del ORF HP0099 en las cepas mutantes de *E. coli* RP4372, RP5700 y RP2361, defectuosas en las MCPs necesarias para la quimioatracción hacia aspartato y serina no complementó sus respectivas mutaciones. Sin embargo, les confirió la capacidad de sensor arginina, bicarbonato y urea como atrayentes. Este resultado sugiere que serina y aspartato no son ligandos de TlpA, sino posiblemente de HP0082 y/o de HP0103 en *H. pylori*. Consistente con esta idea, hemos encontrado que *H. pylori* 43504, que contiene una inserción de un elemento mini-IS605 en el gen *tlpA*, no responde arginina ni bicarbonato de sodio como atrayentes, pero conserva respuestas quimiotácticas hacia aspartato y serina. Por otra parte, la cepa *H. pylori* OC695, que contiene un cassette de resistencia a cloranfenicol en el gen *tlpA*, es incapaz de sensor a arginina y bicarbonato de sodio, de manera análoga a la cepa 43504. Si bien el reconocimiento de bicarbonato de sodio y arginina en *E. coli* transformadas con el ORF HP0099 están de acuerdo con los resultados obtenidos en *H. pylori* 26695, 43504 y OC695, la capacidad de sensor urea en *E. coli* resultó sorprendente. Esta respuesta positiva, podría estar involucrando la sobreexpresión del receptor, que podría tener como un potencial efecto dominante negativo al diluir los complejos necesarios para transducir la señal inducida por urea, que no sería observado en los experimentos de arginina y bicarbonato, ya que estos podrían tener mayor efecto en el cambio conformacional inducido en el receptor por el ligando, necesario para inducir la señal río abajo, o bien sean más afines que urea. Sin embargo, futuros experimentos cinéticos in vitro son necesarios, para descartar dicha posibilidad.

Por otra parte, esta adquisición puede deberse a que el receptor adopta una estructura conformacional distinta en el dominio periplásmico del receptor a la que tiene en *H. pylori*, cambiando la posición y/o exposición de algunos residuos, modificándose el dominio de unión al ligando y permitiendo el reconocimiento de urea como atrayente, debido a la presencia de un grupo guanidinio en este compuesto, de manera similar a la arginina. Por otra parte, el posible cambio en la conformación en *E. coli* podría ocurrir en el dominio citoplasmático, lo que alteraría la interacción con otras proteínas involucradas en la transducción de la señal, como CheA y CheW, que no se encuentran en *H. pylori*, y que por ser arginina y bicarbonato más afines al receptor, no necesitarían mayor número de complejos transductores para amplificar la señal, mientras que si serían necesarias para la la señal gatillada por urea.

Se ha descrito que las interacciones MCP-MCP que formarían arreglos de receptores de distintos tipos, tienen relación con la magnificación de la señal quimioefectora, (Ames y col. (2002), Gestwicki y Kiessling (2002), Lamanna y col. (2002)). Por otra parte, Weis y col. (2003) demostraron que la sobreexpresión del quimiorreceptor Tsr en células de *E. coli* puede inducir alteraciones en la membrana de estas bacterias como consecuencia de las interacciones entre los receptores, lo que podría causar perturbaciones en la magnificación de la señal. Teniendo en cuenta esto, se podría suponer que la sobreexpresión del ORF HP0099 en las cepas mutantes de *E. coli*, estaría

alterando la conformación de dichos "grupos" de receptores, lo que amplificaría la señal percibida frente a la presencia de urea.

Finalmente, considerando los resultados de Mizote y col. (1997) en los que se muestra que *H. pylori* CPY3401 tiene la capacidad de nadar hacia urea, bicarbonato de sodio y sodio, sumados a nuestros resultados de sobreexpresión de HP0099 de la *H. pylori* 26695 en *E. coli* que mostraron quimioatracción hacia urea, se podría considerar que HP0099 codifica un MCP que también puede reconocer urea. De esta manera, si una cepa individual de *H. pylori* reconoce la urea como un probable atrayente o repelente, esto podría depender de las interacciones de TlpA con el conjunto de proteínas Che y/o la presencia del otros MCPs, que pueden ser funcionalmente polimórficos entre distintas cepas de *H. pylori*. Las comparaciones de las secuencias entre distintas cepas de *H. pylori* han demostrado altas tasas de polimorfismos (Akopyants y col., 1992). Un factor adicional que contribuye a esta gran variabilidad genética intraespecífica, se atribuye a una familia de secuencias de mini-inserción relacionadas con el transposon IS605. Estos mini-IS605 conservan los extremos de los elementos más IS605, pero no contienen los elementos *trans* necesarios para la transposición. Éstas se encuentran en una variedad de genes implicados en la interacción de *H. pylori* y la mucosa gástrica humana, incluyendo *rdxA*, *vacA*, *cagI*, y HP0099.

La respuesta quimioatrayente hacia bicarbonato de sodio y arginina puede ser relevante en la persistencia y colonización del estómago en *H. pylori*. El bicarbonato se secreta en la mucosa gástrica a través de los intercambiadores Na^+/H^+ y la respuesta quimiotáctica al bicarbonato. De esta manera, la quimioatracción hacia bicarbonato puede favorecer a la persistencia de *H. pylori* en el epitelio gástrico y en capa mucosa gástrica, facilitando su evasión de la periferia ácida cercana al lumen del estómago, donde existe una mayor acidez.

La quimioatracción hacia arginina podría tener dos papeles importantes en la colonización de *H. pylori*. Por una parte, arginina constituye un requerimiento esencial para *H. pylori*, debido a que es incapaz de sintetizar este aminoácido por la ausencia de los genes implicados en el anabolismo de éste (Tomb y col., 1997), por lo que su captación a partir del medio circundante debe jugar un papel importante en la persistencia de la bacteria en el mucus gástrico. Por otra parte, este aminoácido puede ser incorporado en el ciclo de la urea, siendo sustrato de la enzima arginasa (RocF) generando urea y ornitina. La urea obtenida a partir de arginina podría ser utilizada como sustrato para la ureasa, empleándose en la neutralización del pH ácido (Mendz, y Hazell, 1996).

Dentro de los mecanismos de resistencia al ácido descritos en *E. coli*, se encuentra el sistema tipo III, en el que está involucrado el empleo de arginina por la enzima arginina descarboxilasa. En este sistema, la descarboxilación de la

arginina, convierte a este aminoácido en la poliamina agmatina, consumiéndose un protón en esta reacción. Este sistema tiene acoplado un intercambiador que incorpora arginina y expulsa agmatina en relación 1:1 (Castanie-Cornet y col., 1999). En el genoma de *H. pylori* 26695, se encuentran genes ortólogos para las proteínas constituyentes de este sistema, lo que haría de arginina un aminoácido importante en la resistencia al ácido en *H. pylori*.

Como se mencionó anteriormente, los mutantes en *H. pylori* para los genes *tlpA* y *tlpC* muestran deficiencias en colonizar el estómago frente a cepas silvestres. Por otra parte, recientemente se demostró en gerbils gnotobióticos inoculados con cepas de *H. pylori* mutantes para TlpB, que este gen estaría involucrado en la respuesta inmune del hospedero (Mc Gee y col., 2005). A pesar de estos avances, el estudio de la quimiotaxis como un mecanismo involucrado en los procesos infecciosos y el establecimiento del de la interacción patógeno hospedero no ha sido completamente estudiada, por lo que futuros estudios dirigido hacia esta área serán relevantes a conducir posibles terapias las que si bien probablemente sean ineficientes en la erradicación de la bacteria, si podrían contribuir a evitar la repoblación por *H. pylori* posterior a tratamientos con antibióticos.

7. CONCLUSIONES.

Los aminoácidos arginina, ácido aspártico y serina, y bicarbonato de sodio, constituyen quimioatrayentes para *H. pylori*.

El ORF HP0099 de *H. pylori*, codifica para una proteína quimiorreceptora que reconoce arginina y bicarbonato de sodio como atrayentes. La capacidad de sensor estos compuestos está ausente en la cepa 43504, debido a la presencia de una mini secuencia de inserción IS605 en este gen.

La expresión del receptor TlpA de *H. pylori* en las cepas mutantes RP4372 (*tar*, *tap*) RP5700 (*tar*) y RP2361 (*tsr*) de *E. coli*, les confieren la capacidad de sensor arginina, bicarbonato de sodio y urea como atrayentes.

Al anular el gen *hp0099*, *H. pylori* pierde la capacidad de sensor arginina y bicarbonato de sodio, reafirmando su función codificante para un quimiorreceptor.

8. REFERENCIAS

Aizawa, S.I., Harwood, C. S., Kadner, R. J. (2000) **Signaling components in bacterial locomotion and sensory reception.** *J. Bacteriol.* 182: 1459-1471.

Akopyants, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S., Berg, D.E. (1992) **DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting.** *Nucleic Acids Res.* 20: 5137-5142.

Akopyants, N.S., Clifton, S.W., Kersulyte, D., Crabtree, J.E., Youree, B.E., Reece, C.A., Bukanov, N.O., Drazek, E.S., Roe, B.A., Berg, D.E. (1998) **Analysis of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*.** *Mol. Microbiol.* 28: 37-53.

Alm, R. A., Ling, L. S., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R., Noonan, B., Guild, B. C., deJonge, B. L., Carmel, G., Tummino, P. J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D. M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S. D., Jiang, Q., Taylor, D. E., Vovis, G. F., Trust, T. J. (1999) **Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*.** *Nature* 397: 176-180.

Ames, P., Studdert, C. A., Reiser, R. H., Parkinson, J. S. (2002). **Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 7060-7065.

Andermann, T. M., Chen, Y., Ottemann, K. M. (2002). **Two Predicted chemoreceptors of *Helicobacter pylori* Promote Stomach Infection** *Infect. Immun.* 70: 5877-5881.

Baar, C., Eppinger, M., Raddatz, G., Simon, J., Lanz, C., Klimmek, O., Nandakumar, R., Gross, R., Rosinus, A., Keller, H., Jagtap, P., Linke, B., Meyer, F., Lederer, H., Schuster, S. C. (2003) **Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 11690-11695.

Bespalov, V. A., Zhulin, B., Taylor, B. L. (1996) **Behavioral responses of *E. coli* to changes in redox potential.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 10084-10089.

Bibikov, S. I., Biran, R., Rudd, K. E., Parkinson, J. S. (1997) **A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*.** *J. Bacteriol.* 179: 4075-4079.

Biemann, H-D, Koshland, D. E. (1994) **Aspartate receptors of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* bind ligand with negative and half of the sites cooperativity.** *Biochemistry* 33: 629-634.

Borén, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G., Normark, S. (1993) **Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens.** *Science* 262: 1892-1895.

Borkovich, K. A., Alex, L. A., Simon, M. I. (1992) **Attenuation of sensory receptor signaling by covalent modification.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 6756-6760.

Castanie-Cornet, M-P., Penfound, T.A., Smith, D., Elliott, J.F. Foster, J.W. (1999) **Control of acid resistance in *Escherichia coli*.** *J. Bacteriol.* 181: 3525-3535.

Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., Covacci, A. (1996) **cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 14648-14653.

Chasy, B. M., Mercenier, A., Flickinger, J. (1988). **Transformation of bacteria by electroporation.** *Bio. Techniques* 6: 303-309.

Chervitz S. A., Falke, J. J. (1996) **Molecular mechanism of transmembrane signaling by the aspartate receptor: a model.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2545-2550

Chervitz S. A., Lin, C. M., Falke, J. J. (1995) **Transmembrane signaling by the aspartate receptor: engineered disulfides reveal static regions of the subunit interface.** *Biochemistry* 34: 9722-9733.

Clayton, C. L., Mobley, H. L. T. (1997). ***Helicobacter pylori* Protocols.** Humana Press. Totowa, New Jersey.

Cochran, A. G., Kim, P. S. (1996) **Imitation of *Escherichia coli* aspartate receptor signaling in engineered dimers of the cytoplasmic domain.** *Science* 271:1113-1116.

Croxen, M., Sisson, G., Melano, R., Hoffman, P. (2006) **The *Helicobacter pylori* Chemotaxis Receptor TlpB (HP0103) Is Required for pH Taxis and for Colonization of the Gastric Mucosa.** *J. Bacteriol.* 188: 2656-2665.

Danielson M. A., Biemann, H-P, Koshland, D. E., Falke, J. J. (1994) **Attractant and disulfide induced conformational changes in the ligand-binding domain of the chemotaxis aspartate receptor: a F^{19} NMR study.** *Biochemistry* 33: 6100-6109.

Danielson, M. A., Bass, R. B., Falke, J. J. (1997) **Cysteine and disulfide scanning reveals a regulatory alpha-helix in the cytoplasmic domain of the aspartate receptor.** *J. Biol. Chem.* 272:32878-32888.

Danielson, M. A., Biemann, H. P., Koshland, D. E. Jr, Falke, J. J. (1994) **Attractant- and disulfide-induced conformational changes in the ligand binding domain of the chemotaxis aspartate receptor: a 19F NMR study.** *Biochemistry* 33:6100-6109.

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., Vakil N., Schneider B., Miller M., Zitzer J., Peutz T. y Phadnis S. (1997). **Localization of *Helicobacter pylori* urease and heat shock protein in human gastric biopsies.** *Infect. Immun.* 65: 1181-1188.

Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R., Krakowka, S. (1991) **Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets.** *Infect. Immun.* 59: 2470-2475.

Eaton, K. A., Suerbaum, S., Josenhans, C., Krakowka, S. (1996) **Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes.** *Infect. Immun.* 64: 2445-2448.

Falke, J. J., Bass, R. B., Butler, S. L., Chervitz, S. A., Danielson, M. A. (1997) **The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes.** *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13: 457-512.

Ferry, K., Go, A., Ottermann, K. (2006) **Proteomic mapping of a suppressor of non-chemotactic *cheW* mutants reveals that *Helicobacter pylori* contains a new chemotaxis protein.** *Mol. Microbiol.* 61: 871-882.

Foster, D. L., Mowbray, S. L., Jap, B. K., Koshland, D. E., Jr. (1985) **Purification and characterization of the aspartate chemoreceptor.** *J. Biol. Chem.* 260: 11706-11710.

Francis, N. R., Sosinsky G. E., Thomas D. DeRosier D. J. (1994) **Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex.** *J. Mol. Biol.* 235: 1261-1270.

Gardina, P. J., Bormans, A. F., Hawkins, M. A., Meeker, J. W., Manson, M. D. (1997) **Maltose-binding protein interacts simultaneously and asymmetrically with both subunits of the Tar chemoreceptor.** *Mol. Microbiol.* 23: 1181-1191.

Gestwicki, J. E., Kiessling, L. L. (2002) **Inter-receptor communication through arrays of bacteria chemoreceptors.** *Nature* 415: 81-84.

Gestwicki, J. E., Lamanna, A. C., Harshey, R. M., McCarter, L. L., Kiessling, L. L., Adler, J. (2000) **Evolutionary conservation of methyl-accepting chemotaxis protein location in Bacteria and Archaea.** *J. Bacteriol.* 182: 6499-6502.

Hess, J. F., Oosawa, K., Kaplan, N., Simon, M. I. (1988) **Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis.** *Cell* 53: 79-87.

Homma, M., Shiomi, D., Kawagishi, I. (2004) **Attractant binding alters arrangement of chemoreceptor dimers within its cluster at a cell pole.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 3462-3467.

Hu, L. T., Mobley, H. L. (1990) **Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*.** *Infect Immun.* 58: 992-998.

Hugson, A. G., Hazelbauer, G. L. (1996) **Detecting the conformational change of transmembrane signaling in a bacterial chemoreceptor by measuring effects on disulfide crosslinking in vivo.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 11546-11551.

Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I. M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L, Borén T. (1998) ***Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging.** *Science* 279:373-377.

Jeffery, C. J., Koshland, D. E. (1993) **Three-dimensional structural model of the serine receptor ligand binding domain.** *Protein Sci.* 2: 559-566.

Jeffery, C. J., Koshland, D. E. Jr. (1994) **A single hydrophobic to hydrophobic substitution in the transmembrane domain impairs aspartate receptor function.** *Biochemistry* 33: 3457-3463.

Karatan, E., Saulmon, M. M., Bunn, M. W., Ordal G. W. (2001) **Phosphorylation of a Response Regulator CheV Is required for adaptation to attractants during *Bacillus subtilis* Chemotaxis.** *J. Biol. Chem.* 276: 43618-43626.

Kehry, M. R., Doak, T. G., Dahlquist, F. W. (1984) **Stimulus-induced changes in methylesterase activity during chemotaxis in *Escherichia coli*.** *J. Biol. Chem.* 259: 11828-11835.

Kim, K. K., Yokota, H., Kim, S. H. (1999) **Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor.** *Nature* 400:787-792.

Kirby, J. R., Kristich, C. J., Saulmon, M. M., Zimmer, M. A., Garrity, L. F., Zhulin, I. B., Ordal, G. W. (2001) **CheC is related to the family of flagellar switch proteins and acts independently from CheD to control chemotaxis in *Bacillus subtilis*.** *Mol. Microbiol.* 42: 573-585.

Kolodziej, A. F., Tan, T., Koshland, D. E. (1996) **Producing positive, negative, and no cooperativity by mutations at a single residue located at the subunit interface in the aspartate receptor of *Salmonella typhimurium*.** *Biochemistry* 35: 14782-14792.

Kristich, C. J., Ordal, G. W. (2002) ***Bacillus subtilis* CheD is a chemoreceptor modification enzyme required for chemotaxis.** *J. Biol. Chem.* 277: 25356-25362.

Kuwahara, H., Miyamoto, Y., Akaite, T., Kubota, T., Sawa, T., Okamoto, S., Maeda, H. (2000) ***Helicobacter pylori* Urease Suppresses Bactericidal Activity of Peroxynitrite via Carbon Dioxide Production.** *Infect. Immun.* 68: 4378-4383.

Lamanna, A. C., Gestwicki, J. E., Strong, L. E., Borchardt, S. L., Owen, R. M., Kiessling, L. L. (2002) **Conserved Amplification of Chemotactic Responses through Chemoreceptor Interactions.** *J. Bacteriol.* 184: 4981-4987.

Lin, L. N., Li, J., Brandts, J. F., Weis, R. M. (1994) **The serine receptor of bacterial chemotaxis exhibits half-site saturation for serine binding.** *Biochemistry* 33: 6564-6570.

Maddock, J. R., Shapiro, L. (1993) **Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell.** *Science* 259: 1717-1723.

Manson, M. D., Armitage, J. P., Hoch, J. A., Macnab, R. M. (1998) **Bacterial Locomotion and Signal Transduction.** *J. Bacteriol.* 180: 1009-1022.

Mazunder, R., Phelps, T. J., Krieg, N. R., Benoit, R. E. (1999) **Determining chemotactic responses by two subsurfaces microaerophiles using a simplified capillary assay method.** *J. Microbiol. Methods.* 37: 255-263.

McGee, D. J., Langford, M. L., Watson, E. L., Carter, J. E., Chen, Y. T., Ottemann, K. M. (2005) **Colonization and inflammation deficiencies in Mongolian gerbils infected by *Helicobacter pylori* chemotaxis mutants.** *Infect. Immun.* 73:1820-1827.

Mendz, G.L., Hazell, S.L. (1996) **The urea cycle of *Helicobacter pylori*.** *Microbiology* 142: 2959-2967.

Meyer-Rosberg, K., Scott, D., Rex, D., Melchers K., Sachs G. 1996. **The effect of environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*.** *Gastroenterology* 111: 886- 900.

Milburn, M. V., Privé, G. G., Milligan, D. L., Scott, W. G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshland, D. E. Jr, Kim, S. H. (1991) **Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand.** *Science* 254: 1342-1347.

Miller, J. F. (1994). **Bacterial transformation by electroporation.** *Methods. Enzimol.* 235: 375-385.

Mizote, T., Yoshiyama, H., Nakazawa, T. (1997). **Urease-independent chemotactic responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate** *Infect. Immun.* 65: 1519-1521.

Mowbray, S. L., Foster, D. L., Koshland, D.E. (1985) **Proteolytic fragments identified with domains of the aspartate receptor.** *J. Biol. Chem.* 260: 11711-11718.

Ninfa, E. G., Stock, A., Mowbray, S., Stock, J. (1991) **Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components.** *J. Biol. Chem.* 266:9764-9770.

Nowlin, D. M., Bollinger, J., Hazelbauer, G. L. (1987) **Sites of covalent modification in Trg, a sensory transducer of *Escherichia coli*.** *J. Biol. Chem.* 262: 6039-6045.

Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R. M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Moule, S., Pallen, M. J., Penn, C. W., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., van Vliet, A. H., Whitehead, S., Barrell, B. G. (2000) **The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences.** *Nature* 403:665-668.

Phadnis S. H., Parlow MH, Levy M, Ilver D, Caulkins CM, Connors JB, and Dunn BE. (1996) **Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat**

shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect. Immun.* 64: 905-912.

Pittman, M. S., Goodwin, M., Kelly, D. J. (2001). **Chemotaxis in the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: different roles for CheW and the three CheV paralogues, and evidence for CheV2 phosphorylation.** *Microbiology* 147: 2493-2504.

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.

Rosario, M. M., Fredrick, K. L., Ordal, G. W., Helmann, J. D. (1994) **Chemotaxis in *Bacillus subtilis* requires either of two functionally redundant CheW homologs.** *J. Bacteriol.* 176: 2736-2739.

Sachs, G., Weeks, D. L., Melchers, K., Scott, D. R. (2003) **The gastric biology of *Helicobacter pylori*.** *Annu. Rev. Physiol.* 65: 349-369

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

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5463-5467.

Sardina, P. J., Bormans, A. F., Hawkins, M. A., Meeker, J. W., Manson, M. D. (1997) **Maltose-binding protein interacts simultaneously and asymmetrically with both subunits of the Tar chemoreceptor.** *Mol. Microbiol.* 23:1181-1191.

Schilling, C. H., Covert, M. W., Famili, I., Church, G. M., Edwards, J. S., Palsson, B. O. (2002) **Genome-Scale Metabolic Model of *Helicobacter pylori* 26695.** *J. Bacteriol.* 184: 4582-4593.

Schmitt, R. (2002). **Sinorhizobial chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm.** *Microbiology* 148: 627-631.

Shimizu, T. S., Le Novere, N., Levin, M. D., Beavil, A. J., Sutton, B. J., Bray, D. (2000) **Molecular model of a lattice of signalling proteins involved in bacterial chemotaxis.** *Nat. Cell. Biol.* 2: 792-796.

Sourjik, V., Berg, H. C. (2000) **Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions.** *Mol. Microbiol.* 37: 740-751.

Sourjik, V., Schmitt, R. (1996) **Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*.** *Mol. Microbiol.* 22:427-436.

Stock, J. B., Lukat, G. S., Stock, A. M. (1991) **Bacterial chemotaxis and the molecular logic of intracellular signal transduction networks.** *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 20: 109-136.

Stoddard, B. L., Koshland, D. E. Jr. (1992) **Prediction of the structure of a receptor-protein complex using a binary docking method.** *Nature* 358: 774-776.

Studdert, C. A., Parkinson, J. S. (2005) **Insights into the organization and dynamics of bacterial chemoreceptor clusters through in vivo crosslinking studies.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 15623-15628.

Studdert, C.A., Parkinson, J.S. (2004) **Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 2117-2122.

Suerbaum, S., Josenhans, C., Sterzenbach, T., Drescher, B., Brandt, P., Bell, M., Droge, M., Fartmann, B., Fischer, H. P., Ge, Z., Horster, A., Holland, R., Klein, K., Konig, J., Macko, L., Mendz, G. L., Nyakatura, G., Schauer, D. B., Shen, Z., Weber, J., Frosch, M., Fox, J. G. (2003) **The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*.** *Proc Natl Acad Sci U. S.A.* 100: 7901-7906.

Surette, M. G., Stock, J. B. (1996) **Role of alpha-helical coiled-coil interactions in receptor dimerization, signaling, and adaptation during bacterial chemotaxis.** *J. Biol. Chem.* 271: 17966-17973.

Szurmant, H., Ordal, G. W. (2004) **Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 301-319.

Terwilliger, T. C., Koshland, D. E. Jr. (1984) **Sites of methyl esterification and deamination on the aspartate receptor involved in chemotaxis.** *J. Biol. Chem.* 259: 7719-7725.

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

Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, J. D., Utterback, T. R., Peterson, J. D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidman, J. M., Fujii, C., Bowman, C., Wathley, L., Wallin, E., Hayes, W. S., Borodovsky, M.,

Karp, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M., Venter, J. C. (1997) **The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori***. *Nature* 388: 539-547.

Wadhams, G. H., Armitage, J. P. (2004) **Making sense of it all: bacterial chemotaxis**. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5:1024-1037.

Wang, Y., Taylor, D. E. (1990) **Cloramphenicol resistance in *Campylobacter coli*: nucleotide sequence, expression, and cloning vector construction**. *Gene* 94: 23-28.

Webre, D. J., Wolanin, P. M., Stock, J. B. (2004) **Modulated receptor interactions in bacterial transmembrane signaling**. *Trends. Cell. Biol.* 14: 478-482.

Weis, R. M., Hirai, T., Chalah, A., Kessel, M., Peters, P. J., Subramaniam S. (2003) **Electron Microscopic Analysis of Membrane Assemblies Formed by the Bacterial Chemotaxis Receptor Tsr**. *J. Bacteriol.* 185: 3636-3643.

Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T. R., Fareed, G. C., Richardon, C. C. (1968). **Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4**. *J. Biol. Chem.* 243: 4543-4555.

9. APÉNDICE: PUBLICACIONES GENERADAS POR ESTE SEMINARIO DE TÍTULO

1. Cerda, O., Rivas, A., Toledo, H. *Helicobacter pylori* strain ATCC700392 encodes a methyl-accepting chemotaxis receptor protein (MCP) for arginine and sodium bicarbonate. FEMS Letters, 224 (2003):175-181.
2. Valenzuela, M., Cerda, O., Toledo, H. An overview on chemotaxis and Acid resistance in *Helicobacter pylori*. Biol. Research, 36 (2003):429-436.

Helicobacter pylori strain ATCC700392 encodes a methyl-accepting chemotaxis receptor protein (MCP) for arginine and sodium bicarbonate

Oscar Cerda, Ana Rivas, Héctor Toledo *

Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70086, Santiago-7, Chile

Received 14 January 2003; received in revised form 7 May 2003; accepted 9 May 2003

First published online 25 June 2003

Abstract

Helicobacter pylori ATCC43504 responds chemotactically to aspartic acid and serine, but not to arginine, nor to sodium bicarbonate. In contrast, *H. pylori* ATCC700392 (strain 26695) shows chemotaxis to all four attractants. Open reading frame HP0099 from *H. pylori* 26695 is predicted to encode one of three methyl-accepting chemotaxis receptor proteins (MCPs). When *Escherichia coli* is transformed with a plasmid carrying HP0099 from strain 26695, the recombinants acquire chemotaxis to arginine, bicarbonate, and urea. In *H. pylori* 43504, the HP0099 gene is interrupted with a mini-IS605 insertion, which accounts for its inability to recognize arginine and bicarbonate as attractants. Together, these results argue that the *H. pylori* HP0099 gene encodes an MCP for arginine and bicarbonate. © 2003 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Chemotaxis; Signal transduction; HP0099; IS605; *Helicobacter pylori*

1. Introduction

The colonization of the human host by many bacterial pathogens is dependent on flagella. Flagellated bacteria swim toward chemical attractants and away from repellents by a mechanism known as chemotaxis. As yet, we know little about how these microorganisms use the ability to swim to their advantage, to colonize their human host. Chemotaxis is an adaptive response to microenvironmental changes, and is regulated by a complex signal transduction mechanism [1]. Flagellated bacteria express four sets of genes necessary for chemotaxis. These include the *fla* and other genes involved in the assembly of flagella, the *mot* genes encoding components of the flagellar motor, the *che* genes involved in the regulation of chemotactic responses, and the *mcp* genes encoding the methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs). MCPs are membrane-spanning proteins that interact with specific ligands, and transduce information across the cell membrane to the intracellular Che proteins. The Che proteins relay signals from

the MCPs to the flagellar motor, which drives flagellar rotation.

Helicobacter pylori is a microaerophilic Gram-negative pathogen, and has a bundle of unipolar flagella [2]. *H. pylori* can penetrate the gastric mucous layer, and causes gastric ulcers, adenocarcinomas, and lymphomas [2–4]. The colonization of the gastric mucosa by *H. pylori* depends on its ability to make urease, as well as on its flagella, and chemotaxis [5–7]. *H. pylori* produces large amounts of cytoplasmic urease constitutively [5], and releases urease due to autolysis [8]. Presumably, the main role of urease is to neutralize the acidic microenvironments colonized by *H. pylori*, by producing ammonia and carbon dioxide from urea. *H. pylori* flagella are a mosaic of two flagellins, FlaA and FlaB [9]. Both flagellin subunits are necessary for full motility on soft agar plates and for full colonization of gnotobiotic piglets. An aflagellated strain of *H. pylori* colonizes the stomach less frequently [6].

In the stomach of infected patients, *H. pylori* resides mainly in the surface mucous layer [10]. Because this gelatinous layer has a rapid turnover [11], bacteria proliferating in this layer must retain the ability to move toward the stomach epithelial cell surface, and against the mucous flow toward the duodenum. For this reason, the motility

* Corresponding author. Tel.: +56 (2) 678 6053;
Fax: +56 (2) 735 5580.
E-mail address: htoledo@machi.med.uchile.cl (H. Toledo).

of *H. pylori* should be important for bacterial growth, colonization, and persistent infection.

The complete genome sequences of two *H. pylori* strains have been determined, strains 26695 [12], and J99 [13]. Three *H. pylori* open reading frames (ORFs), HP0082, HP0099, and HP0103, in the genome sequence of strain 26695 (ATCC700392), are predicted to encode MCPs, with homology to those of other bacteria. To understand how the motility of *H. pylori* contributes to its virulence, we have identified a subset of the attractants to which *H. pylori* responds, and the MCP responsible for a subset of these chemotactic responses. Our results show that the *H. pylori* HP0099 gene encodes an MCP for the attractants arginine and sodium bicarbonate. This is the first report in which the substrate specificity of an MCP from *H. pylori* has been identified.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. Frozen stocks of *H. pylori* were incubated in biphasic cultures on *H. pylori* selective supplement (Dent from Oxoid) trypticase soy agar supplemented with 5% horse serum under microaerobic conditions using a Gaspack jar and a Campygen atmosphere generator pack (Oxoid), at 37°C for 24 h. Bacteria were then transferred to plates and incubated for 24–48 h in an incubator with 5.5% CO₂ and 80% humidity [14]. *Escherichia coli* strains were grown in Luria–Bertani (LB) medium supplemented with ampicillin (Amp; 100 µg ml⁻¹) and/or kana-

mycin sulfate (Kan; 20 µg ml⁻¹), when appropriate. Media were from Difco and Becton-Dickinson.

2.2. Motility assays

Bacterial cells grown microaerobically at 37°C for 2 days on *H. pylori* selective supplement (Dent from Oxoid) trypticase soy agar plates were stabbed with toothpicks into 0.3% agar plates containing trypticase soy broth supplemented with 5% horse serum.

2.3. Chemotaxis assays

Chemotaxis assays were carried out by the method of Mazunder et al. [15]. Cells were scraped from plates, suspended in chemotaxis buffer (10 mM potassium phosphate, pH 7; 3% w/v polyvinylpyrrolidone) to a concentration of 3 × 10⁸ cells ml⁻¹, and 100 µl of the bacterial suspension was drawn into a disposable 200 µl pipet tip. Solutions of compounds to be tested (10 mM, unless otherwise noted) for a chemotactic response (100 µl in chemotaxis buffer) were drawn up through a 25-gauge needle into a 1-ml syringe, and the point of the syringe–needle combination was submerged into the bacterial suspension. After incubation of the test apparatus horizontally for 45 min at 30°C, the syringe was removed from the bacterial suspension, its contents were diluted serially in chemotaxis buffer, and the dilutions were plated onto agar serum plates. The titers of cells that had accumulated in the syringe were measured as colony forming units. Syringes containing chemotaxis buffer alone were included in each experiment as controls. Test compounds were identified as attractants if the relative chemotaxis response (RCR), cal-

Table 1
Bacterial strains and plasmids

Strain/plasmid	Characteristics	Source/ reference
<i>H. pylori</i>		
ATCC700392	strain 26695	Tomb [12]
ATCC43504		
<i>E. coli</i>		
RP437	{ <i>thr</i> (Am)-1 <i>leuB</i> -6 <i>his</i> -4 <i>metF</i> (Am)-59 <i>eda</i> -50 <i>rpsL</i> 136 [<i>thi</i> -1 <i>ara</i> -14 <i>lacY</i> -1 <i>mtl</i> -1 <i>xyl</i> -5 <i>tonA</i> -31 <i>tsx</i> -78]}	Parkinson
RP4372	{ <i>thr</i> (Am)-1 <i>leuB</i> -6 <i>his</i> -4 <i>metF</i> (Am)-59 <i>eda</i> -50 <i>rpsL</i> 136 [<i>thi</i> -1 <i>ara</i> -14 <i>lacY</i> -1 <i>mtl</i> -1 <i>xyl</i> -5 <i>tonA</i> -31 <i>tsx</i> -78]} Δ(<i>tar</i> - <i>tap</i>)	Parkinson
RP5700	{ <i>thr</i> (Am)-1 <i>leuB</i> -6 <i>his</i> -4 <i>metF</i> (Am)-59 <i>eda</i> -50 <i>rpsL</i> 136 [<i>thi</i> -1 <i>ara</i> -14 <i>lacY</i> -1 <i>mtl</i> -1 <i>xyl</i> -5 <i>tonA</i> -31 <i>tsx</i> -78]} Δ(<i>tsr</i>)	Parkinson
RP2361	{ <i>thr</i> (Am)-1 <i>leuB</i> -6 <i>his</i> -4 <i>metF</i> (Am)-59 <i>eda</i> -50 <i>rpsL</i> 136 [<i>thi</i> -1 <i>ara</i> -14 <i>lacY</i> -1 <i>mtl</i> -1 <i>xyl</i> -5 <i>tonA</i> -31 <i>tsx</i> -78]} Δ(<i>tar</i>)	Parkinson
RP4372/pHA99	RP4372 transformed with pGPI-2 and pHA99	This work
RP 4372/pHA699	RP4372 transformed with pGPI-2 and pHA699	This work
RP 5700/pHA99	RP5700 transformed with pGPI-2 and pHA99	This work
RP 2361/pHA99	RP2361 transformed with pGPI-2 and pHA99	This work
Plasmids		
pUC19	Amp ^R	Gibco BRL
pET21a	Amp ^R T7lac fl-ori His-Tag	Novagen
pGPI-2	Kan ^R T7 RNAPol P _{lac} <i>cf</i> -857	Tabor [20]
pHP99	HP0099 ORF from ATCC43504 ligated to pUC19	This work
pHP9915	HP0099 ORF from ATCC700392 ligated to pUC19	This work
pHA699	HP0099 ORF from ATCC43504 ligated to pET21a	This work
pHA99	HP0099 ORF from ATCC700392 ligated to pET21a	This work

culated as the ratio of the bacteria that entered the test needle–syringes to those in the control needle–syringes, was ≥ 2 [15–17]. Test compounds with an RCR ≤ 0.5 were identified as repellents. Results are expressed as the means of at least five independent experiments involving duplicate test and control assays. Data were considered to be statistically significant if the differences between control and test titers had *P* values of < 0.05 , as determined by the Student's *t*-test.

2.4. DNA manipulations and genetic techniques

Primers (CGATTGGACGTCTTTTAAATCC and CC-CGCAAAGCTTCTTTAGC) were designed to amplify HP0099, one of the three genes predicted to encode MCPs, using the genome sequence of *H. pylori* strain 26695 [12] as our starting sequence. Conditions used for PCR were those of the Expand[®] Long Template PCR system (Boehringer Mannheim), with chromosomal DNA prepared from *H. pylori* strains 43504 and 26695 as templates [18]. PCR products were subcloned into pUC19 to make plasmids pHP99 from *H. pylori* 43504 and pHP9915 from *H. pylori* 26695 (Table 1). Additional primers (CCCCA-TATGTTGTCTAAAGGTTTGAGTATCGG and CCC-CTCGAGTAATCGCCCTCGAGCAATTC) were used to amplify these inserts, the products were cleaved with *Nde*I and *Xho*I, then ligated to plasmid pET21a (Novagen), to make plasmids pHA99 and pHA699, respectively. Inserts were sequenced by the method of Sanger et al. [19], to confirm that PCR amplification had not introduced additional mutations in the HP0099 sequences.

2.5. Expression of HP0099 in *E. coli*

To construct derivatives of *E. coli* expressing HP0099, *E. coli* was first electroporated with pGPI-2 [20], then with plasmid subclones of the gene in vector pET21a (Table 1). To express HP0099, electroporants were grown to exponential density in LB Amp Kan medium at 30°C, shifted to 42°C for 30 min to induce the expression of T7 RNA polymerase, and incubated at 37°C for 30 min. Cells were collected by centrifugation, resuspended in chemotaxis buffer and sonicated, and intracellular proteins were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis [21]. Cells were also assayed for their chemotactic responses to a variety of substrates before and after heat induction, using the method of Mazunder et al. [15].

3. Results

3.1. Strains of *H. pylori* show different chemotactic responses to arginine, bicarbonate, and urea

To characterize the chemotactic responses of *H. pylori*, we first determined whether the two type strains of

H. pylori with which we work, 26695 and 43504, are motile. Both strains spread extensively when stabbed into soft agar plates, behavior characteristic of flagellated bacteria with chemotactic responses.

Second, we designed a quantitative assay to measure the chemotactic responses of these strains. In this assay, chemotaxis is measured as the ability of resuspended cells to swim up a needle and into a syringe carrying a solution of attractant. We tested several potential attractants, including urea and sodium bicarbonate, which the bacteria produce to neutralize the acidic microenvironment, Ni²⁺ ion, a urease cofactor, and the amino acids required for the growth of *H. pylori*. As shown in Fig. 1, *H. pylori* strains 26695 and 43504 both respond to aspartate and serine as attractants, and to urea and Ni²⁺ as repellents. Neither strain responds to alanine, cysteine, glutamate, histidine, leucine, methionine, or tryptophan, additional auxotro-

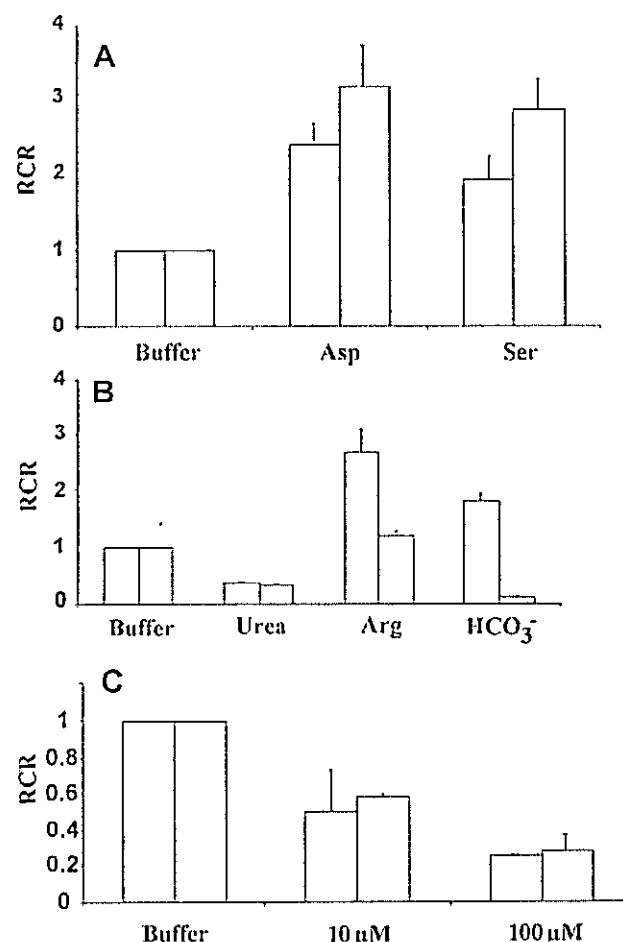


Fig. 1. *H. pylori* responds chemotactically to aspartate, serine, arginine, bicarbonate and Ni²⁺. Open bars correspond to *H. pylori* 43504 and filled bars to *H. pylori* 26695. The chemotactic response is expressed as RCR, as described in Section 2. Each bar represents the average data from five or more independent experiments. A: Both strains recognize aspartate and serine as attractants. B: Whereas strain 26695 recognizes arginine and bicarbonate as attractants, strain 43504 does not. C: Both strains recognize nickel chloride as a repellent.

phic requirements of *H. pylori* (not shown). These two strains differ in their responses to arginine and bicarbonate. Strain 26695 responds to both as attractants, whereas strain 43504 shows no significant response to arginine, and may recognize bicarbonate as a repellent.

To understand the differences in the chemotactic responses to arginine and bicarbonate between these two *H. pylori* strains, we explored the possibility that a genetic difference between their MCP-encoding genes might account for these differences.

3.2. The MCP-encoding gene, HP0099, is interrupted by an insertion sequence in *H. pylori* strain 43504, but not in strain 26695

To characterize the MCP-encoding genes in *H. pylori* strains 26695 and 43504, we amplified, subcloned and sequenced the HP0099 gene from each strain, as described in Section 2. As expected, we found that the sequence of the HP0099 gene from *H. pylori* strain 26695 is identical to that in its complete genome sequence. In contrast, when we compared the sequence of HP0099 from 43504 with that from 26695, we found a surprising difference. The strain 43504 HP0099 gene has an insertion 371 bp long at nucleotide bp 318 within this ORF, with respect to the 26695 sequence. This insertion is that of a mini-IS605 element, a small IS specific to *H. pylori*, and is flanked

by 49-bp and 41-bp ends. The left end of the mini-IS605 element in HP0099 is identical to that of full-length IS605 (GenBank AC000108) [22], and the right end shares 83% identity with that of a mini-IS605 element reported by Censini et al. [23] (Fig. 2). BLAST analysis of this mini-IS605 element shows that it shares significant identity with internal sequences of *rdxA* (100%), encoding a NAD(P)H nitroreductase that catalyzes the conversion of metronidazole from a prodrug to an antibiotic; *vacA* (94%), encoding a vacuolating cytotoxin; and *cagI* (93%), encoding a pathogenicity determinant (Fig. 2).

Together, these results argue in support of the hypothesis that HP0099 encodes an MCP that recognizes the attractants arginine and bicarbonate, and the failure of strain 43504 to respond to these attractants is due to the inactivation of the HP0099 gene by a mini-IS605 insertion.

3.3. Expression of *H. pylori* gene HP0099 in *E. coli* confers the ability to respond to arginine, sodium bicarbonate, and urea as chemoattractants

E. coli produces two major MCPs, Tar, which responds to aspartic acid as an attractant and Ni²⁺ as a repellent, and Tsr, which recognizes serine as an attractant [24]. *E. coli* does not respond to arginine or bicarbonate as attractants. To test the hypothesis that the *H. pylori* HP0099 gene encodes an MCP that responds to arginine

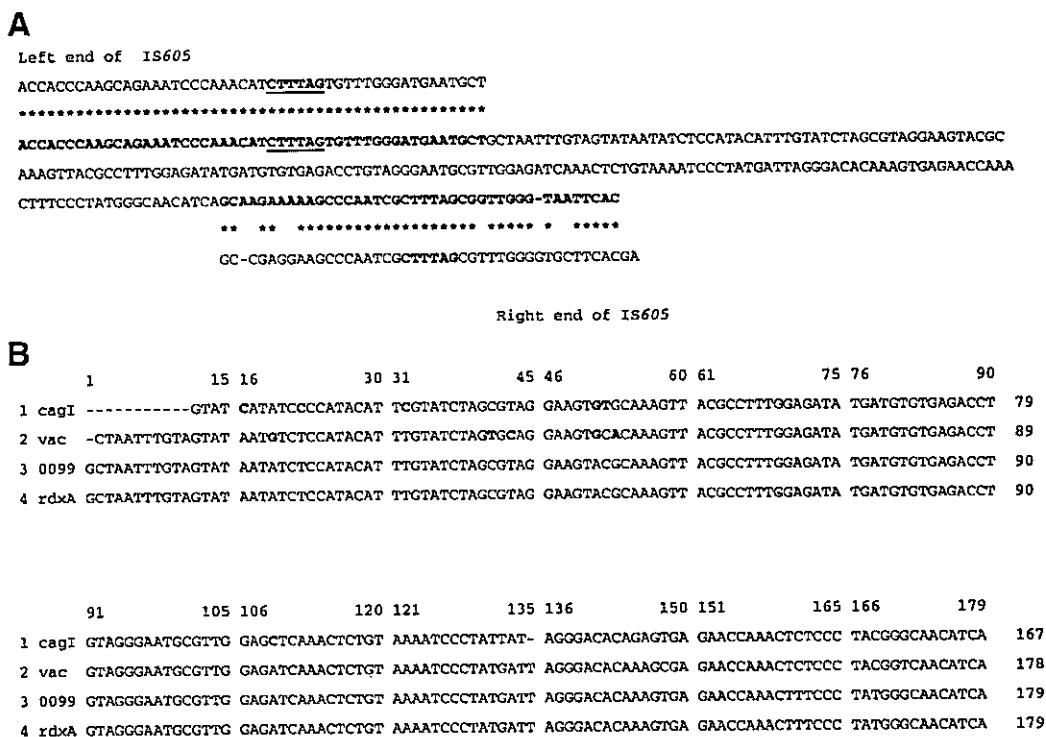


Fig. 2. Mini-IS605 insertions are found in a variety of *H. pylori* genes. At the top (A) is shown the nucleotide sequence of the mini-IS605 insertion in ORF HP0099 of *H. pylori* strain 43504 aligned with the sequences of the left and right ends of the full-length IS605 element. Asterisks indicate identity between the sequences of full-length IS605 and mini-IS605 from HP0099 of *H. pylori* 43504. B: Alignment of the internal sequence of the mini-IS605 element in HP0099 with those found in the *cagI*, *vacA* and *rdxA* genes; differences between these latter sequences and the element in HP0099 are indicated in boldface.

and bicarbonate as attractants, we expressed this gene in mutant derivatives of *E. coli* missing one or more MCPs, and tested whether these recombinant strains have acquired the ability to recognize arginine and bicarbonate as attractants. Because we have shown that *H. pylori* also responds to aspartic acid and serine as attractants (Fig. 1), we also tested the responses of the recombinant strains to these compounds.

The *E. coli* strains we used in this experiment are the otherwise isogenic derivatives of parent strain RP4372 ($\Delta tar-tap$), RP5700 (Δtsr) and RP2361 (Δtar) (Table 1). Each strain was transformed with plasmid pGP1-2, which expresses T7 RNA polymerase from the inducible phage λP_L promoter. Plasmid pGP1-2 also carries the gene encoding a temperature-sensitive λ repressor (*cI-857*) expressed constitutively from the *lac* promoter. In this strain, λ repressor inhibits transcription from the P_L promoter at low temperature (30°C). At high temperature (42°C), λ repressor is inactivated, resulting in the expression of T7 RNA polymerase, which can drive the expression of a target gene from the T7 early promoter present on a second plasmid.

Plasmids pHA99 and pHA699 carry the HP0099 genes from strains 26695 and 43504, respectively, and place expression of these genes under the control of the phage T7 early promoter. These plasmids were introduced into derivatives of *E. coli* RP437 with plasmid pGP1-2 by electroporation. After heat induction, strains with plasmid pHA99 (with an intact HP0099 gene), but not those with pHA699 (with HP0099 interrupted by a mini-IS605 insertion), were found to express a new protein with an apparent molecular mass in agreement with that predicted from the HP0099 sequence (results not shown).

To assay the chemotactic responses of these recombinant strains, we compared samples of cells grown at 30°C with those prepared after heat induction, using the capillary assay [15]. All the *E. coli* strains carrying plasmid pHA99 displayed chemotaxis to arginine, bicarbonate, and urea after heat induction (Fig. 3). In contrast, *E. coli* RP4372 carrying plasmid pHA699 did not show chemotaxis to arginine, bicarbonate, or urea. *E. coli* strains with deletions of *tar* or *tsr* were not complemented by plasmid pHA99 for chemotaxis toward aspartic acid or serine as attractants (Fig. 3). Because the expression of *H. pylori*

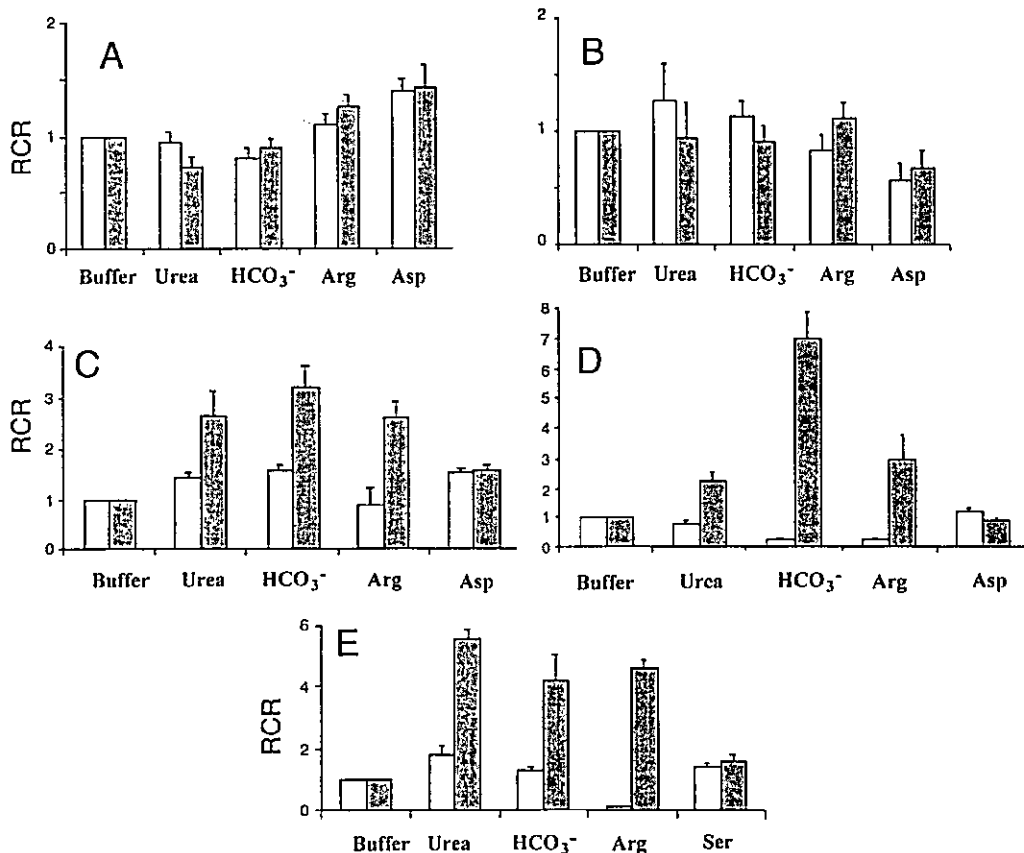


Fig. 3. Expression of *H. pylori* HP0099 in *E. coli* results in a gain of function, chemotaxis toward arginine, bicarbonate, and urea. The figure shows the RCR of strains of *E. coli* carrying plasmid pGP1-2 and a second plasmid with or without an active HP0099 gene to aspartate, serine, arginine, urea, and sodium bicarbonate. Open bars correspond to cells grown at 30°C, and filled bars to cells following heat induction. A: Control strain RP4372 ($\Delta tar-tap$) with pGP1-2 and pET21a plasmids. B: Strain RP4372 ($\Delta tar-tap$) with pGP1-2 and pHA699. C: Strain RP4372 ($\Delta tar-tap$) with pGP1-2 and pHA99. D: Strain RP2361 (Δtar) with pGP1-2 and pHA99. E: Strain RP5700 (Δtsr) with pGP1-2 and pHA99.

HP0099 in *E. coli* results in a gain of function, chemotaxis toward arginine, sodium bicarbonate, and urea, we conclude that HP0099 encodes an MCP that recognizes arginine and bicarbonate as attractants in *H. pylori*.

4. Discussion

In this report, we have shown that *H. pylori* strain 26695 displays chemotaxis toward the attractants aspartic acid, serine, arginine, and sodium bicarbonate, and away from the repellents Ni^{2+} and urea. The complete genome sequence of this strain includes three ORFs predicted to encode MCPs, HP0082, HP0099, and HP0103. We have amplified, cloned, and expressed one of these three ORFs in *E. coli*, and have shown that the expression of HP0099 from a plasmid in *E. coli* results in a gain of function, the ability to respond to arginine, bicarbonate, and urea as attractants. In contrast, the expression of a mutant HP0099 gene with a mini-IS605 insertion from an otherwise isogenic plasmid in *E. coli* does not result in this gain of function. These results show that HP0099 encodes an MCP for these substrates.

Expression of HP0099 in mutants of *E. coli* defective in MCPs necessary for its responses to aspartate and serine does not confer the ability to recognize these chemicals as chemoattractants. This result suggests that these amino acids are not substrates of HP0099, but rather are substrates of HP0082 and/or HP0103 in *H. pylori*. Consistent with this idea, we have found that *H. pylori* strain 43504, which carries an insertion of a mini-IS605 element in its HP0099 gene, does not respond to arginine or bicarbonate as attractants, but retains chemotactic responses to aspartate and serine.

Mizote et al. [25] have shown that *H. pylori* strain CPY3401 has the ability to swim toward urea, sodium bicarbonate, and sodium ions. Under the conditions of our assay, we could not detect the significant chemotaxis of strain 26695, nor of two other clinical isolates of *H. pylori*, toward urea as an attractant. Rather, for strain 26695, urea appears to act as a repellent. Conversely, the overexpression of HP0099 from strain 26695 in *E. coli* results in a gain of function, chemotaxis toward urea, in this heterologous host. Taken together, these results show that HP0099 encodes an MCP that also recognizes urea. Whether an individual isolate of *H. pylori* recognizes urea as an attractant or repellent likely depends on the interactions of the HP0099 MCP with the ensemble of Che proteins and/or the presence of other MCPs, which appear to be functionally polymorphic among different *H. pylori* isolates.

Sequence comparisons among *H. pylori* isolates have shown them to be highly polymorphic [26]. We have found an additional factor that contributes to this extensive, intraspecific genetic variability, a family of mini-insertion sequences related to transposon IS605. These mini-IS605

elements retain the unique ends of the larger IS605 elements, but appear to have lost the functions required in *trans* for transposition. They are found in a variety of genes involved in the interaction of *H. pylori* with its human host, including *rdxA*, *vacA*, *cagI*, and HP0099.

Recently, Andermann et al. [7] have shown that mutant strains of *H. pylori* with inactive HP0099 or HP0082 genes can colonize mice as well as the wild-type strain, but are defective in competition with the wild-type strain upon coinfection of mice. They concluded that the MCPs encoded by these genes likely assist in the colonization of the stomach.

It is not surprising that chemotaxis toward bicarbonate and arginine might be important in the process of stomach colonization by *H. pylori*. Bicarbonate is secreted into the gastric mucosa by chloride–bicarbonate exchangers localized in parietal cells and Na^+ – H^+ exchangers distributed in mucous neck, chief, and surface mucous cells [27]. A chemotactic response to bicarbonate may contribute to the persistence of *H. pylori* in the gastric epithelia and in the gastric mucous layer, by facilitating its evasion of the acidic periphery of the mucous layer and movement towards the epithelial cell surface. A chemotactic response to arginine may play two important roles in survival and colonization. First, *H. pylori* does not synthesize L-arginine, and must obtain this amino acid from extracellular sources. Second, the chemotaxis of *H. pylori* toward arginine may help maximize substrate turnover by its arginase. *H. pylori* arginase inhibits nitric oxide (NO) production by activated macrophages at physiological concentrations of L-arginine, the common substrate for NO synthase and arginase. Mutations that inactivate the gene encoding the constitutively expressed arginase in *H. pylori* permit the high-level production of NO by macrophages, and stimulate the NO-dependent killing of *H. pylori* by macrophages [28]. Arginase also catalyzes the first step in the conversion of arginine to urea, the substrate of urease [29], a critical colonization factor.

Acknowledgements

We thank Dr. John S. Parkinson for kindly providing *E. coli* strains. We also thank Dr. Philip Youderian, for helpful comments during the preparation of the manuscript. This work was supported by Grant 1980721 from FONDECYT.

References

- [1] Manson, M.D., Armitage, J.P., Hoch, J.A. and Macnab, R.M. (1998) Bacterial locomotion and signal transduction. *J. Bacteriol.* 180, 1009–1022.
- [2] Dunn, B.E., Cohen, H. and Blaser, M.J. (1997) *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 720–741.

- [3] Warren, J.R. and Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* i, 1273–1275.
- [4] Parsonnet, J., Hasnen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J.H. and Friedman, G.D. (1994) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 330, 1267–1271.
- [5] Mobley, H.L.T., Island, M.D. and Hausinger, R.P. (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59, 451–480.
- [6] Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C. and Krakowka, S. (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect. Immun.* 64, 2445–2448.
- [7] Andermann, T.M., Chen, Y.-T. and Ottemann, K.M. (2002) Two predicted chemoreceptors of *Helicobacter pylori* promote stomach infection. *Infect. Immun.* 70, 5877–5881.
- [8] Phadnis, S.H., Parlow, M.H., Levy, M., Ilver, D., Caulkins, C.M., Connors, J.B. and Dunn, B.E. (1996) Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect. Immun.* 64, 905–912.
- [9] Josenhans, C., Labigne, A. and Suerbaum, S. (1995) Comparative ultrastructure and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J. Bacteriol.* 177, 3010–3020.
- [10] Kirschner, D.E. and Blaser, M.J. (1995) The dynamics of *Helicobacter pylori* infection of the human stomach. *J. Theor. Biol.* 176, 281–290.
- [11] Messier, B. and Leblond, C.P. (1960) Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine-H3 into male rats and mice. *Am. J. Anat.* 106, 247–265.
- [12] Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J.D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley, J.M., Cotton, M.D., Weidman, J.M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M. and Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388, 539–547.
- [13] Alm, R.A., Ling, L.S., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan, B., Guild, B.C., de Jonge, B.L., Carniel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F. and Trust, T.J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397, 176–180.
- [14] Toledo, H., Valenzuela, M., Rivas, A. and Jerez, C.A. (2002) Acid stress response in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* 213, 67–72.
- [15] Mazunder, R., Phelps, T.J., Krieg, N.R. and Benoit, R.E. (1999) Determining chemotactic responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay method. *J. Microbiol. Methods* 37, 255–263.
- [16] Adler, J. (1973) A method for measuring chemotaxis and use the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 74, 77–91.
- [17] Moulton, R.C. and Montic, T.C. (1979) Chemotaxis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 137, 274–280.
- [18] Owen, R.J. and Bickley, J. (1997) Isolation of *H. pylori* genomic DNA and restriction analysis. In: *Methods in Molecular Medicine: Helicobacter pylori Protocols* (Clayton, C.L. and Mobley, H.L.T., Eds.), pp. 81–88. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [19] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.
- [20] Tabor, S. and Richardson, C.C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767–4771.
- [21] Delgado, M., Toledo, H. and Jerez, C.A. (1998) Molecular cloning, sequencing, and expression of a chemoreceptor gene from *Leptospirillum ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2380–2385.
- [22] Akopyants, N.S., Clifton, S.W., Kersulyte, D., Crabtree, J.E., Younce, B.E., Reccc, C.A., Bukanov, N.O., Drazek, E.S., Roc, B.A. and Berg, D.E. (1998) Analysis of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 28, 37–53.
- [23] Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. and Covacci, A. (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14648–14653.
- [24] Dahl, M., Boos, W. and Manson, M. (1989) Evolution of chemotactic-signal transducers in enteric bacteria. *J. Bacteriol.* 171, 2361–2371.
- [25] Mizote, T., Yoshiyama, H. and Nakazawa, T. (1997) Urease-independent chemotaxis responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitor, and sodium bicarbonate. *Infect. Immun.* 65, 1519–1521.
- [26] Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S. and Berg, D.E. (1992) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 20, 5137–5142.
- [27] Stuart-Tilley, A., Sardet, C., Pouyssegur, J., Schwartz, M.A., Brown, D. and Alper, S.L. (1994) Immunolocalization of anion exchanger AE2 and cation exchanger NHE-1 in distinct adjacent cells of gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* 266, C559–C568.
- [28] Gobert, A.P., McGee, D.J., Akhtar, M., Mendz, G.L., Newton, J.C., Cheng, Y., Mobley, H.L.T. and Wilson, K.T. (2001) *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: A strategy for bacterial survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13844–13849.
- [29] Mendz, G.L. and Hazell, S.L. (1996) The urea cycle of *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 142, 2959–2967.

Overview on chemotaxis and acid resistance in *Helicobacter pylori*

MANUEL VALENZUELA, OSCAR CERDA and HÉCTOR TOLEDO

Laboratorio de Microbiología Molecular, Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Key terms: *Helicobacter pylori*; acid tolerance response; chemotaxis; urease.

INTRODUCTION

Sensing chemicals in the environment and responding to changes in their concentrations is a fundamental property of a living cell. It is particularly important for unicellular organisms that constantly interact with the environment. Many bacterial pathogens colonize the hosts assisted by the flagella, but little is known about how these microbes use the ability to swim when they are inside of animal hosts. Motility is often driven by flagella, which is a complex extracellular structure that requires energy for operation. Motile flagellated bacteria swim toward chemical attractants and away from repellents by a mechanism known as chemotaxis. Chemotaxis is a response to microenvironmental changes and is controlled by probably the best-studied signal transduction system (Liu et al., 1997; Manson et al., 1998). Taxis responses allow motile microorganisms to rapidly move toward a microenvironment optimal for their growth and survival. The mechanism of flagellar motility and its control via chemotaxis have been studied in great detail in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Bren and Eisenbach, 2000; Stock and Levit, 2000; Stock et al., 2000). Enteric motile bacteria can measure concentrations of chemicals outside the cell

using transmembrane receptors that transmit information into the cell interior. They normally express the *mcp* and *che* genes in order to regulate chemotaxis behavior. The methyl accepting chemotaxis proteins (MCPs) interact with specific ligands, while the Che proteins relay the appropriate signals from the MCPs to the flagellar motor. When attractants such as amino acids, sugars and dipeptides are present, bacteria sense the concentration gradient of attractants and swim towards them.

Enteric pathogens must survive at the acid pH of the stomach in order to gain entrance into the stomach or intestine to cause diseases. Pathogenic microorganisms that prefer to grow at neutral pH exhibit widely varying abilities to survive at extreme pH values. The enteric pathogens can protect themselves from acid in several basic ways. They can prevent protons from entering the cell, pump protons out of the cell, or once internal pH reaches a dangerous acid zone, they could protect or repair damage to macromolecules. Also, they could synthesize key enzymes that can function when internal pH falls. Our laboratory is currently investigating the basic response of acid tolerance in *Helicobacter pylori* that protect the cell further down to pH 6 and the chemotactic properties of this microorganism.

The microorganism

Helicobacter pylori is a neutralophilic, Gram-negative, ureolytic and motile bacterium unique in its ability to colonize the normal human stomach. It is microaerophilic, spiral-shaped bacillus, 3-5 μm long and about 0.5 μm in diameter, with six flagella at one pole, (Dunn et al., 1997). Its genome has been sequenced and it has about 1500 open reading frames coding for a variety of proteins, and about two-thirds of known function by homology with other proteins (Tomb et al., 1997). The spiral body of this microorganism, with its bundle of unipolar flagella, is well adapted for penetrating the gastric mucous layer and for swimming rapidly in a viscous environment (Warren and Marshall, 1983; Hazel et al., 1986; Jung et al., 1997; Nakamura et al., 1998). It is also well established that *H. pylori* colonizes the mucous layer of gastric epithelium and is a causative agent for peptic ulcer disease, gastric adenocarcinoma, and gastric lymphoma (Warren and Marshall, 1983; Parsonnet et al., 1994; Dunn et al., 1997). The bacteria reside mostly within the gastric mucus layer, but a few microorganisms (20%) are associated with the gastric epithelia, and the former population is present to replenish the latter (Kirschner and Blaser, 1995; Yoshiyama and Nakazawa, 2000). *H. pylori* has adapted remarkably well to variations of pH in their environment. Many neutralophilic organisms, such as *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* or *Salmonella typhimurium*, are adapted to transit the acidity of the gastric juice (Young et al., 1996; Merrell and Camilli, 1998; Chevelli et al., 1996). They do not colonize the stomach but instead have developed acute acid resistance mechanisms. Only one organism, *H. pylori* has adapted itself to allow not only survival in, but also habitation of the human stomach.

Several factors are thought to be involved in the colonization by *H. pylori* of the gastric mucosa including urease activity and motility using flagella (Mobley et al., 1995; Eaton et al., 1996).

Acid Resistance in *H. pylori*

H. pylori is also unique in having a large amount of urease in the cytoplasm at neutral pH but is greatest in the outer portion at acidic pH in the wild-type strain (Mobley et al., 1995; Hong et al., 2003). Urease is synthesized constitutively by the microorganism accounting for about 10-15% of the total protein synthesized by the bacterium (Bauerfeind et al., 1997). The enzyme is a two-subunit Ni^{2+} containing protein, and it does not have a signal peptide at the N-terminal suggesting a cytoplasmic localization. However, a portion of the bacterial population releases the urease by cellular autolysis allowing the anchorage of the enzyme on the surface of intact cells (Phadnis et al., 1996). The main role of urease is thought to be the neutralization of acidic microenvironments by producing NH_3 and CO_2 . Thereby, urease is an obvious candidate for the acid resistance mechanism of *H. pylori*. The urease activity of intact cells increased nearly exponentially when decreases the external pH. This activation is not due to enhanced gene expression at low external pH values. In cell extracts the pH optimum of urease activity is dependent on the buffer system and is about pH 5 in sodium citrate buffer. Since this is the cytoplasmic pH of the cells at pH 1 to 2, Stingl et al. (2002) propose that the cytoplasmic pH is a key factor in the *in vivo* activation of the urease at low external pH values.

With the activity of carbonic anhydrase also encoded in the genome of *H. pylori*, the CO_2 generated will be able to increase the buffering capacity of the cytoplasm to resist internal alkalinization due to the generation of NH_3 . The NH_3 produced can act as a buffer leaving the bacterial cytoplasm and entering the bacterial periplasm, by the formation of NH_4^+ . It was previously believed that urease located on the cell surface created a neutral microenvironment that was conducive to bacterial survival, however it has been shown that intracellular urease actually plays a key role in promoting acid resistance (Scott et al., 2002). This role results from the availability of urease.

There are seven genes within the urease operon, *ureABIEFGH*, *ureA* and *ureB* are the structural subunits of the urease, whereas *ureE*, *F*, *G* and *H* are thought to be accessory genes necessary for formation of an active urease by insertion of Ni^{+2} into the UreA/UreB protein complex. Their removal results in loss of urease activity. *ureI* is not essential for the activity of urease (Sachs et al., 2003).

The dilemma of how intracellular urease gains access to its extracellular substrate was recently solved by the identification of UreI as an inner membrane proton-gated urea-specific channel (Weeks et al., 2000). This work demonstrated that the UreI pore opens, as the pH of the medium drops below pH 5.5 and cytoplasmic urease is able to gain access to the urea. As the enzyme activity neutralizes the local environment, the pore closes and the urea transport stops, thus providing a regulated level of urease activity. Urea in the gastric juice is able to access the intrabacterial urease if periplasmic pH falls below 6 owing to pH-gating of the urea channel, UreI. As a result of this, NH_3 is formed and neutralizes the bacterial periplasm to a pH 6.2. Urease shifts from the cytoplasm to the outside of the cell as a result of an extracellular decrease in pH. This difference is independent of the presence of urea, but it is UreI-dependent, suggesting an additional role of UreI in urease-dependent acid resistance (Hong et al., 2003).

Site-directed mutagenesis and chimeric analysis have identified several amino acids involved in maintaining the closed state of channel UreI at neutral pH (Sachs et al., 2003). Also it was concluded that the first periplasmic loop of UreI is implicated in channel opening/closing at acidic and neutral pH, and the second periplasmic loop and the C terminus require protonatable amino acid residues to allow the function of the channel (Weeks and Sachs, 2001).

The UreI of *H. pylori* is homolog to UreI of *H. hepaticus* and *S. salivarius* (Beckwith et al., 2001; Chen et al., 1998). The UreI products from the three bacteria have considerable homology in their predicted membrane domains, and some in the cytoplasmic domain, and little in the

periplasmic domain. Although all are urea channels, those of *S. salivarius* are equally active at neutral and acidic pH, whereas those of *H. pylori* and *H. hepaticus* are acid activated.

In addition to this acid resistance mechanism it has been shown by 2-D isoelectric focusing non-equilibrium pH gel electrophoresis that *H. pylori* has a urease-independent acid stress response system (Toledo et al., 2001; Toledo et al. 2002). This mechanism shows that about 49 proteins change their levels of expression due to the acidic pH, operate at mild acidic pH and they are under Fur control (Valenzuela and Toledo, personal communication). In addition to these mechanisms, other acid-inducible systems have been described: the acid tolerance response (Toledo et al., 2001, personal communication; Toledo et al., 2002; Karita and Blaser, 1998), the acid-induced expression of LPS (McGowan et al., 1998), and the inducible hsp70 stress protein (Huesca et al., 1998). Also, by using the whole genome approaches, proteomic and promoter analysis, it is known that *H. pylori* varies its gene expression when the bacteria is grown under acidic conditions (Bijlsma and Lie-A-Ling, 2000; Jungblunt et al., 2000; Ang et al., 2001; Allan et al., 2001; Dong et al., 2001; Toledo et al., 2002; Merrell et al., 2003; McGowan et al., 2003). However, there is a general lack of agreement between these studies emphasizing the complexity of *H. pylori*'s response to acid and the difficulty in comparing single time point experiments for the assessment of global transcription or global translation.

Chemotaxis in H. pylori

H. pylori flagella contain two flagellin molecules, FlaA the major species, and FlaB, which is expressed in minor amounts (Josenhans et al., 1995; O'Toole et al., 2000). Flagellar motion appears to be essential for infection of animal models, since deletion mutants of the flagellar system are also unable to colonize (Foyne et al., 1999). Both flagellin molecules are

necessary for full motility on soft agar plates and for full colonization of gnotobiotic piglets, whereas an aflagellated strain colonizes the stomach less frequently (Eaton et al., 1996). *H. pylori* apparently expresses six Che cytoplasmatic signal transduction proteins that regulate the swimming of the bacteria and are the products of the following ORFs: HP0019 (*cheV*), HP0393 (*cheV*), HP0616 (*cheV*), HP0391 (*cheW*), HP1067 (*cheY*), and HP0392 (*cheA*) (Tomb et al., 1997; Foynes et al., 2000; Pittman et al., 2001). In addition to these components, there is a family of transmembrane proteins, the methyl-accepting chemotaxis proteins or MCPs, with putative receptor functions, known as HP0082, HP0099, HP0103; these are orthologs to *tlpC*, *tlpA* and *tlpB* from *Bacillus subtilis*, respectively (Tomb et al., 1997).

In the stomachs of infected patients, the bacteria reside mainly in the mucous layer (Yoshida et al., 1993; Kirschner and Blaser, 1995). Because the gel layer has a rapid turnover (Messier and Leblond, 1960), the bacterium proliferating in the mucous layer should have the ability to move toward the epithelial cell surface, against the mucous flow toward the duodenum. We hypothesize that chemotaxis in *H. pylori* must be crucial for bacteria colonization and persistent infection.

Recently, it has been demonstrated that *H. pylori* has the ability to sense and move towards urea, sodium bicarbonate, sodium ions (Mizote et al., 1997) and also to aspartate and serine (Toledo and Rivas, 1999, personal communication; Cerda et al., 2003). Urea is synthesized in the liver, circulated by the blood stream, and secreted into the gastric juice through a capillary network beneath the gastric epithelial surface (Niethercut et al., 1993). Thus, a concentration gradient of urea is formed in the gastric mucus layer, which should be sensed by *H. pylori*. Bicarbonate is also secreted into the gastric mucosa by chloride-bicarbonate exchangers localized in parietal cells and $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchangers distributed in the mucous neck, chief, and mucous surface cells, respectively (Stuart-Tilley et al., 1994). In addition, *H. pylori* might be able

to swim fast at low pH because the flagellar motor is powered by a proton motive force (Yoshiyama et al., 1999). Thus, orally uptaken *H. pylori* can promptly evade the acidic periphery of the mucous layer and move towards the epithelial surface by chemoattraction of substances such as urea and bicarbonate, which diffuse out from the gastric epithelial surface.

The chemotactic response to urea could be crucial not only for acid resistance, but also for colonization in the hostile environment. *H. pylori* in the mucus layer may sense urea and move toward the epithelial cell surface, which must be important for persistent infection of this microorganism. Our results about urea chemotaxis with four different strains indicated that *H. pylori* is not attracted by urea even if the assay is done at pH 7 or mild acid pH (Cerda and Toledo, personal communication; Cerda et al., 2003). Nevertheless, these results are in disagreement with the observation of Mizote et al. (1997) that reported chemotaxis to urea in *H. pylori* CPY3401. This different response could be attributed to the presence of the surface urease in *H. pylori* (Phadnis et al., 1996), that may hydrolyze the urea rapidly before becoming a signal to chemotactic system or each *H. pylori* clinical isolate differs genetically from most other independent isolates based on DNA fingerprint and sequence analysis (Akopyanz et al., 1992; Achtman et al., 1999). Superimposed on this great general diversity, several sub-populations of *H. pylori* have been identified that are relatively distinct genetically, with each specific to a different geographic region or human ethnic group (Achtman et al., 1999; Jeong et al., 2000; Kersulyte et al., 2000).

Physiological significance of chemotaxis in H. pylori

Nitric oxide (NO), the NO synthase product, is known to play an important role in host defense against a variety of microbes (Doi et al., 1993; Fang, 1997; Nathan, 1997) although NO itself does not show sufficient antimicrobial activity (Yoshida et al., 1993;

Kaplan et al., 1996). Peroxynitrite (ONOO⁻), a metabolite of NO, is considered to be responsible for the antimicrobial effect. NO and superoxide (O₂⁻) react forming ONOO⁻, a strong oxidant and nitrating agent (Beckman et al., 1990; Ischiropoulos, 1998). In recent years, increased expression of inducible NO synthase (iNOS) has been confirmed in *H. pylori*-infected gastric tissues of patients and experimental animals (Tatemichi et al., 1998; Fu et al., 1999; Goto et al., 1999). Furthermore, it has recently been reported that not only phagocytic inflammatory cells but also *H. pylori* itself produce O₂⁻ (Nagata et al., 1998), which indicates that ONOO⁻ may be formed into and around the bacteria *in vivo*. Consequently, ONOO⁻ may function as a major bactericidal effector for *H. pylori* in the stomach. Recently, Kuwahara et al. (2000) reported that CO₂ formed by bacterial urease inhibits the reactivity of ONOO⁻ with the bacterial components and accelerates its decomposition outside the bacterial cells. Also, formation of nitrotyrosine in *H. pylori* was suppressed by the addition of urea or sodium bicarbonate. In this context, it is quite reasonable to think that *H. pylori* has evolved with a system capable of detoxifying ONOO⁻, and hence steady and sustained colonization in the infected stomach is facilitated.

Bicarbonate is also secreted into the gastric mucosa (Stuart-Tilley et al., 1994) and chemotactic response to sodium bicarbonate (Cerdea and Toledo, personal communication; Cerdeza et al., 2003; Mizote et al., 1997) may contribute to the persistence of *H. pylori* in the gastric epithelia and in the gastric mucus layer. Gastric mucosa is markedly adverse to bacterial colonization, as the physical and chemical barriers encountered (mucus, enzymes, and acid) inhibit colonization by common bacteria.

Arginine has a guanidine chemical group that is close to the chemical structure of urea. Cerdeza demonstrated that *H. pylori* also shows chemotaxis to arginine (Cerdeza and Toledo, personal communication; Cerdeza et al., 2003). Amino acid metabolism is essential for *H. pylori* growth (Marais et

al., 1999), this microorganism does not synthesize L-arginine (Tomb et al., 1997; Doig et al., 1999) and therefore the bacterium must obtain this amino acid from extracellular sources. In this way chemotaxis to arginine could play a role allowing the bacteria to find the arginine source.

It was proposed that *H. pylori* arginase inhibits nitric oxide production by activated macrophages at physiological concentrations of L-arginine, the common substrate for NO synthase and arginase. On the other hand, inactivation of the gene *rocF*, encoding constitutively expressed arginase in *H. pylori*, restored high-output NO production by macrophages, resulting in marked NO-dependent killing of *H. pylori* (Gobert et al., 2001). This observation indicates that the bacterial arginase has evolved as a survival mechanism that may contribute to the ability of *H. pylori* to successfully colonize the human stomach. Also, arginine could protect the microorganism from toxic effects of gastric acidity by raising the pH of its microenvironment. Being a substrate of arginase, a highly active enzyme of the urea cycle (Mendez and Hazell, 1996), arginine would be converted to urea, which in turn is the substrate of urease, an enzyme that has been accepted as an environmental modulator. In addition, the high-frequency usage of arginine and also lysine in *H. pylori* proteins (Tomb et al., 1997) may be one adaptation that favors survival in acidic environments.

Arginine is not used as a nitrogen source since has been postulated that ammonium can be obtained by deamination of asparagine, aspartate and glutamine (Mendez and Hazell, 1995) and it is also proposed that it could be the major source of carbon, converting it into α -ketoglutarate, which can be routed through-out the majority of central metabolism.

The scavenging of arginine, bicarbonate and other substances like urea is an important factor for *H. pylori* colonization and persistence in the gastric mucus layer and motility plays a key role. In this way chemotaxis could play a fundamental role in these processes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work received financial support from FONDECYT 1980721 and ENL-2001/03.

REFERENCES

- ACHTMAN M, AZUM T, BERG D E, ITO Y, MORELLI G, PAN Z J, SUERBAUM S, THOMPSON A, VAN DER ENDE A, VAN DOORN L J (1999) Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol* 32:459-470
- AKOPYANZ N, BUKANOV N O, WESTBLOM TU, KRESOVICH S, BERG DE (1992) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 20:5137-5142
- ALLAN E, CLAYTON CL, MCLAREN A, MCLAREN A, WALLACE DM, WREN BW (2001) Characterization of the low-pH responses of *Helicobacter pylori* using genomic DNA arrays. *Microbiology* 147: 2285-2292
- ANG S, LEE CZ, PECK K, SINDICE M, MATRUBUTHAM U, GLEESON MA, WANG JT (2001) Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: study in genomic scale by microarray. *Infect Immun* 69:1679-1686
- BAUERFEIND P, GARNER R, DUNN BE, MOBLEY H (1997) Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* 40:25-30
- BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, MARSHALL PA, FREEMAN BA. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624
- BECKWITH CS, MCGEE DJ, MOBLEY HL, RILEY LK (2001) Cloning, expression, and catalytic activity of *Helicobacter hepaticus* urease. *Infect Immun* 69:5914-5920
- BIJLSMA JJ, LIE-A-LING M (2000) Identification of loci essential for the growth of *Helicobacter pylori* under acidic conditions. *J Infect Dis* 182:1566-1569
- BREN A, EISENBACH M (2000) How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation. *J Bacteriol* 182:6865-6873
- CASTANIE-CORNET M-P, PENFOUND TA, SMITH D, ELLIOTT JF, FOSTER JW (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:3525-3535
- CERDA O, TOLEDO H (2002) The Hp0099 ORF is a methyl accepting chemotactic protein in *Helicobacter pylori*. *Biol Res* 35:R-111 (156)
- CERDA O, RIVAS A, TOLEDO H (2003) *Helicobacter pylori* strain ATCC700392 encodes a methyl-accepting chemotaxis receptor protein (MCP) for arginine and sodium bicarbonate. *FEMS Microbiol Letters* 224:175-181
- CHEN YY, WEAVER CA, MENDELSON DR, BURNE RA. (1998) Transcriptional regulation of the *Streptococcus salivarius* 57.1 urease operon. *J Bacteriol* 180:5769-5775
- CHEVELLI AM, ARNOLD KW, BUCHRIESER C, CHENG CM, KASPER CW (1996) RpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62:1822-1825
- DOIT, ANDO M, AKAIKE T, SUGAM, SATOK, MAEDA H (1993) Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect Immun* 61:1980-1989
- DOIG P, DE JONGE BL, ALM RA, BROWN ED, URIANICKELSEN M, NOONAN B, MILLS S, TUMMINO P, CARMEL G, GUILD BC, MOIR DT, VOVIS GF, TRUST TJ (1999) *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:675-707
- DONG Q, HYDE D, HERRA C, KEAN C, MURPHY P, O'MORAIN CA, BUCKLEY M (2001) Identification of genes regulated by prolonged acid exposure in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Letters* 196: 245-249
- DUNN BE, COHEN H, BLASER MJ (1997) *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 10:720-741
- EATON KA, SUERBAUM S, JOSEPHANS C, KRAKOWKA S (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* 64:2445-2448
- FANG FC (1997) Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 99:2818-2825
- FOYNES S, DORRELL N, WARD SJ, STABLER RA, MCCOLM AA, RYCROFT AN, WREN BW (2000) *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa. *Infect Immun* 68:2016-2023
- FU S, RAMANUJAM KS, WONG A, FANTRY GT, DRACHENBERG CB, JAMES SP, MELTZER SJ, WILSON KT (1999) Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology* 116:1319-1329
- GOBERT AP, MCGEE DJ, AKHTAR M, MENDZ GL, NEWTON JC, CHENG Y, MOBLEY HLT, WILSON KT (2001) *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: A strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13844-13849
- GOTO T, HARUMA K, KITADAI Y, ITO M, YOSHIHARA M, SUMII K, HAYAKAWA N, KAJIYAMA G (1999) Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* 5:1411-1415
- HAZEL SL, LEE A, BRADY L, HENNESSY W (1986) *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* 153:658-663
- HONG W, SANO K, MORIMATSU S, SCOTT DR, WEEKS DL, SACHS G, GOTO T, MOHAN S, HARADA F, NAKAJIMA N, NAKANO T (2003) Medium pH-dependent redistribution of the urease of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 52:211-216
- HUESCA M, GOODWIN A, BHAGWANSINGH A, HOFFMAN P, LINGWOOD CA (1998) Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 66:4061-4067

- ISCHIROPOULOS H (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 356:1-11
- JEONG J-Y, MUKHOPADHYAY AK, DAILIDIENE D 20 other authors. (2000) Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 182:5082-5090
- JOSEPHANS C, LABIGNE A, SUERBAUM S (1995) Comparative ultrastructure and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol* 177:3010-3020
- JUNG HC, KIM JM, SONG IS, KIM CY (1997) Increased motility of *Helicobacter pylori* by methycellulose could upregulate the expression of proinflammatory cytokines in human gastric epithelial cells. *Scand J Clin Lab Invest* 57:263-270
- JUNGBLUT PR, BUMANN D, HAAS G, ZIMNY-ARNDT U, HOLLANDS S, LAMER S, SIEJAK F, AEBISCHER A, MEYER TF (2000) Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 36: 710-725
- KAPLAN SS, LANCASTER JR, BASFORD RE, SIMMONS RL (1996) Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infect Immun* 64:69-76.
- KARITA M, BLASER MJ (1998) Acid-tolerance response in *Helicobacter pylori* and differences between *cagA*⁺ and *cagA*⁻ strains. *J Infect Dis* 178:213-219
- KERSULYTED, MUKHOPADHYAY AK, VELAPATIÑO B 28 other authors. (2000) Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J Bacteriol* 182:3210-3218
- KIRSCHNER DE, BLASER MJ (1995) The dynamics of *Helicobacter pylori* infection of the human stomach. *J Theor Biol* 176:281-290
- KUWAHARA H, MIYAMOTO Y, AKAIKE T, KUBOTA T, SAWA T, OKAMOTO S, MAEDA H (2000) *Helicobacter pylori* Urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production. *Infect Immun* 68:4378-4383
- LIU Y, LEVIT M, LURZ R, SURETTE MG, STOCK JB (1997) Receptor-mediated protein kinase activation and the mechanism of transmembrane signaling in bacterial chemotaxis. *EMBO J* 16:7231-7240
- MANSON MD, ARMITAGE JP, HOCH JA, MACNAB RM (1998) Bacterial locomotion and signal transduction. *J Bacteriol* 180:1009-1022
- MARAIS A, MENDZ GL, HAZELL SL, MEGRAUD F (1999) Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:642-74
- MERRELL DS, CAMILLI A (1998) The *cadA* gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Mol Microbiol* 34:836-849
- MERRELL DS, GOODRICH ML, OTTO G, TOMPKINS LS, FALKOW S (2003) pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 71:63529-3539
- McGOWAN CC, NECHEVA A, THOMPSON SA, COVER TL, BLASER MJ (1998) Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 30:19-31
- McGOWAN CC, NECHEVA AS, FORSYTH MH, COVER TL, BLASER MJ (2003) Promoter analysis of *Helicobacter pylori* genes with enhanced expression at low pH. *Mol Microbiol* 48:1225-1239
- MENDZ GL, HAZELL SL (1995) Amino acid utilization by *Helicobacter pylori*. *Int J Biochem Cell Biol* 27:1085-1093
- MENDZ GL, HAZELL SL (1996) The urea cycle of *Helicobacter pylori*. *Microbiol* 142:2959-2967
- MESSIER B, LEBLOND CP (1960) Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine-H3 into male rats and mice. *Am J Anat* 106:247-265
- MOBLEY HLT, ISLAND MD, HAUSINGER RP (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.* 59: 451-480
- MIZOTE T, YOSHIYAMA H, NAKAZAWA T (1997) Urease-independent chemotaxis responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitor, and sodium bicarbonate. *Infect Immun* 65:1519-1521
- NAGATA K, YU H, NISHIKAWA M, KASHIBA M, NAKAMURA A, SATO EF, TAMURA T, INOUE M (1998) *Helicobacter pylori* generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J Biol Chem* 273:14071-14073
- NAKAMURA H, YOSHIYAMA H, TAKEUCHI H, MIZOTE T, OKITA K, NAKAZAWA T (1998) Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect Immun* 66:4832-4837
- NATHAN C (1997) Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100:2417-2423
- NIETHERCUT WD, ROWE PA, NUJUMI AM, DAHILL S, MCCOLL KEL (1993) Effect of *Helicobacter pylori* infection on intragastric urea and ammonium concentration in patients with chronic renal failure. *J Clin Pathol* 46:544-547
- O'TOOLE PW, LANE MC, PORWOLLIK S (2000) *Helicobacter pylori* motility. *Microb Infect* 2:1207-1214
- PARSONNET J, HASNEN S, RODRIGUEZ L, GELB AB, WARNKE RA, JELLUM E, ORENTREICH N, VOGELMAN JH, FRIEDMAN GD (1994) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330:1267-1271
- PHADNIS SH, PARLOW MH, LEVY M, ILVER D, CAULKINS CM, CONNORS JB, DUNN BE (1996) Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect Immun* 64:905-912
- PITTMAN MS, GOODWIN M, KELLY DJ (2001) Chemotaxis in the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: different roles for CheW and the three CheV paralogues, and evidence for CheV2 phosphorylation. *Microbiology* 147:2493-2504
- SACHS G, WEEKS DL, MELCHERS K, SCOTT DR (2003) The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol* 65:349-369
- SCOTT DR, MARCUS EA, WEEKS DL, SACHS G (2002) Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 123:187-195
- STINGL K, UHLEMANN E-M, SCHMID R, ALTENDORF K, BAKKER EP (2002) Energetics of *Helicobacter pylori* and its implications for the mechanism of urease-dependent acid tolerance at pH 1. *J Bacteriol*, 184:3053-3060

- STOCK J, LEVIT M (2000) Signal transduction: hair brains in bacterial chemotaxis. *Curr Biol* 10:R11-R14
- STOCK AM, ROBINSON VL, GOUDREAU PN (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69:183-215
- STUART-TILLEY A, SARDET C, POUYSSEGUR J, SCHWARTZ MA, BROWN D, ALPER SL (1994) Immunolocalization of anion exchanger AE2 and cation exchanger NHE-1 in distinct adjacent cells of gastric mucosa. *Am J Physiol* 266:C559-568
- TATEMACHI M, OGURA T, NAGATA H, ESUMI H (1998) Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in chronic gastritis with intestinal metaplasia. *J Clin Gastroenterol* 27:240-245
- TOLEDO H, RIVAS A (1999) *Helicobacter pylori* and Chemotaxis. *Biol Res* 32:R-237(128)
- TOLEDO H, RIVAS A, JEREZ CA (2001) Does *Helicobacter pylori* possess an acid stress response? *Biol Res* 32:R-123(210)
- TOLEDO H, VALENZUELA M, RIVAS A, JEREZ CA (2002) Acid stress response in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Letters* 213:67-72
- TOMB JF, WHITE O, KERLAVAGE AR 39 other authors. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539-547
- VALENZUELA M, TOLEDO H (2002) The acid stress response is under Fur control in *Helicobacter pylori*. *Biol Res* 35:R-111(157)
- WARREN JR, MARSHALL B (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* i 1273-1275
- WEEKS DL, ESKANDARI S, SCOTT DR, SACHS G (2000) A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 287(5452):482-5
- WEEKS DL, SACHS G (2001) Sites of pH regulation of urea channel of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 40:1249-1259
- YOSHIDA A, AKAIKE T, DOI T, SATO K, IJIRI S, SUGA M, ANDO M, MAEDA H (1993) Pronounced enhancement of ·NO-dependent antimicrobial action by an ·NO-oxidizing agent, imidazolineoxyl N-oxide. *Infect Immun* 61:3552-3555
- YOSHIYAMA H, NAKAMURA H, KIMOTO M, OKITA K, NAKAZAWA T (1999) Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *J Gastroenterol* 34[Suppl XI]: 18-23
- YOSHIYAMA H, NAKAZAWA T (2000) Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect* 2:55-60
- YOUNG GM, AMID D, MILLER VL (1996) A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. *J Bacteriol* 178:6487-6495