

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**“CLONACIÓN, SOBREEXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA
ENZIMA ENOLASA DE *Helicobacter pylori*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

M. en C. MARÍA DE JESÚS LÓPEZ LÓPEZ

REYNOSA, TAMPS.

OCTUBRE 2019

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**“CLONACIÓN, SOBREEXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA
ENZIMA ENOLASA DE *Helicobacter pylori*”**

TESIS

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

PRESENTA

M. en C. MARÍA DE JESÚS LÓPEZ LÓPEZ

DIRECTORES DE TESIS

DR. XIANWU GUO

DRA. CLAUDIA G. BENITEZ CARDOZA

COMITÉ TUTORIAL

DRA. ANA MARÍA SIFUENTES RINCÓN

DRA. CLAUDIA PATRICIA LARRALDE CORONA

DR. GILDARDO RIVERA SÁNCHEZ

DR. MARIO ALBERTO RODRÍGUEZ PÉREZ

DR. RAYMUNDO ROSAS QUIJANO



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 3 del mes de Julio del año 2019, la que suscribe María de Jesús López López alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro A120776, adscrita al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Xianwu Guo, Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza y cede los derechos del trabajo titulado “Clonación, sobreexpresión y análisis de la estructura de la enzima enolasa de *Helicobacter pylori*”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

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

María de Jesús López López



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14
 REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 10:00 horas del día 1 del mes de Julio del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CBG para examinar la tesis titulada: "Clonación, sobreexpresión y análisis de la estructura de la enzima enolasa de *Helicobacter pylori*" por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	LÓPEZ	Apellido Materno:	LÓPEZ	Nombre (s):	MARÍA DE JESÚS
-------------------	-------	-------------------	-------	-------------	----------------

Número de registro: A 1 2 0 7 7 6

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de la lectura y revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **NO APROBAR** la tesis, en virtud de los motivos siguientes:

Comisión Revisora de Tesis

Dr. Xianwu Guo
 Director de Tesis
 12914-ED-17, Colegiado, E3017

Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez
 12162-EF-16, Colegiado, E3017

Dra. Ana María Sifuentes Rincón
 13369-EG-18, Colegiado, E3017

Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza
 2º Director de Tesis
 14310-EF-19/6, Colegiado, E3014

Dr. Gildardo Rivera Sánchez
 12752-EC-17, Colegiado, E3017

Presidente del Colegio de Profesores
 Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez
 Nombre

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA

ÍNDICE

Sección	Página
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS Y/ O NOMENCLATURA	xiii
AGRADECIMIENTOS	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Género <i>Helicobacter</i>	1
1.2 <i>Helicobacter pylori</i>	3
1.2.1 Morfología	3
1.2.2 Diversidad genética.....	5
1.2.3 Epidemiología	5
1.2.4 Tratamiento	8
1.2.5 Resistencia bacteriana	9
2.1 Enolasa	12
2. ANTECEDENTES.....	13
2.2.1 Estructura primaria de enolasa	13
2.2.2 Obtencion de enolasa recombinante	13
2.2.3 Estructura secundaria y terciaria de enolasa	16

2.2.3.1 Estabilidad termica.....	19
2.2.3.2 Entalpia de activación (ΔH^\ddagger).....	21
2.2.4 Estructura cuaternaria de enolasa.....	21
2.2.5 Función glucolítica de enolasa.....	23
2.2.6 Enolasa: proteína multifuncional	24
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos específicos	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1 <i>Materiales</i>	32
6.1.1 Material genético.....	32
6.1.2 Células competentes.....	32
6.1.3 Vectores.....	33
6.2 <i>Métodos</i>	35
6.2.1 Preparación de células calcio-competentes.....	35
6.2.2 Amplificación del gen de la enolasa de <i>H. pylori</i>	36
6.2.3 Construcción de vector de clonación (pGEM [®] -T Easy::hpeno)	38
6.2.4 Sub-clonación, construcción de vector de expresión (pET-19b_modif::hpeno).....	44
6.2.5 Obtención de la proteína recombinante enolasa de <i>H. pylori</i>	49
6.2.6 Extracción de proteínas de cuerpos de inclusión	50
6.2.7 Cromatografía por afinidad a níquel	51
6.2.8 Eliminación del tracto de histidinas	52
6.2.9 Purificación de hpENO cortada	53

6.2.10 Preparación de la muestra hpENO	53
6.2.11 Caracterización estructural de proteína recombinante hpENO.....	53
6.2.12 Desplegamiento térmico.....	55
6.2.13 Cinéticas de despliegamiento	57
6.2.14 Actividad catalítica.....	58
6.2.15 Determinación de sitios blancos de hpENO	59
7. RESULTADOS.....	60
7.1 Amplificación del gen de la enolasa de <i>H. pylori</i>	60
7.2. Construcción de vector de clonación (pGEM®-T Easy::hpeno) y vector de expresión (pET-19b modificado::hpeno)	60
7.3 Obtención de la proteína recombinante enolasa de <i>H. pylori</i>	65
7.4 Caracterización estructural de proteína recombinante hpENO.....	69
7.4.1 Caracterización de estructura primaria.....	69
7.4.2 Caracterización de estructura secundaria y terciaria	74
7.4.3 Modelo de estructura de enolasa de <i>H. pylori</i>	82
7.5 Estabilidad térmica de hpENO.....	83
7.6 Cinéticas de des-plegamiento.....	87
7.7 Entalpía de activación (ΔH^\ddagger).....	87
7.8 Actividad catalítica de hpENO.....	89
7.9 Sitios blancos de enolasa de <i>H. pylori</i>	91
8. DISCUSIÓN	93
8.1 Obtención de la proteína recombinante enolasa de <i>H. pylori</i>	93
8.2 Caracterización estructural de proteína recombinante hpENO.....	95
8.3 Estabilidad térmica de hpENO y entalpía de activación (ΔH^\ddagger)	98
8.4 Actividad catalítica de hpENO.....	99

9. CONCLUSIONES	102
10. PERSPECTIVAS.....	104
11. BIBLIOGRAFÍA	105

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Especies del género <i>Helicobacter</i>	2
2. Aminoácidos de importancia catalítica para la enolasa de levadura.	14
3. Actividad específica mostrada por enolasa de diferentes especies.	25
4. Funciones no glucolíticas reportadas para la enolasa.	28
5. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen <i>hpeno</i>	36
6. Concentración de reactivos empleados en la amplificación de <i>hpeno</i>	37
7. Condiciones de amplificación de <i>hpeno</i>	37
8. Concentración de reactivos de reacción de ligación pGEM [®] -T Easy:: <i>hpeno</i>	38
9. Condiciones de lisis de células para PCR en colonia.	39
10. Concentración de reactivos para PCR en colonia.	40
11. Condiciones de amplificación de PCR en colonia.	40
12. Mezcla de reacción de digestión de pGEM [®] -T easy:: <i>hpeno</i>	42
13. Oligonucleótidos de región promotora de pGEM [®] -T Easy.	42
14. Reacción de secuenciación de inserto en pGEM [®] -T Easy.	43
15. Condiciones de amplificación para reacción de secuenciación.	43
16. Volumen de reactivos de reacciones de digestión de las construcciones de vectores.	44
17. Reacción de ligación pET-19b modificado:: <i>hpeno</i>	46
18. Mezcla de reacción digestión de pET-19b_modificado:: <i>hpeno</i>	48
19. Oligonucleótidos de región promotora de pET-19b.	48
20. Reacción de secuenciación de inserto en pET-19b_modificado:: <i>hpeno</i>	48
21. Reactivos para preparación de geles acrilamida:bisacrilamida (29:1).	50
22. Porcentaje de identidad y similitud entre enolasas.	70
23. Temperaturas del punto medio de desnaturalización térmica (T_m) para <i>hpENO</i>	85
24. Entalpía de activación característica de enolasa.	89
25. Sitios blanco seleccionados para enolasa de <i>H. pylori</i>	92

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Morfología de <i>Helicobacter pylori</i>	4
2. Mapa global interactivo de prevalencia de <i>Helicobacter pylori</i>	7
3. Tasas de resistencia a los antibióticos en diferentes zonas continentales.	10
4. Espectros de dicroísmo circular de enolasa de <i>P. falciparum</i> y levadura.	18
5. Espectros de dicroísmo circular de enolasa de <i>S. pyogenes</i>	18
6. Espectros de emisión de fluorescencia de enolasa de <i>P. falciparum</i> y levadura.	20
7. Desnaturalización térmica de la enolasa de levadura.	20
8. Estructuras cuaternarias de enolasa de <i>E. coli</i> y <i>C. jejuni</i>	22
9. Representación esquemática del vector de pGEM [®] -T Easy.	34
10. Esquema general de plásmido pET-19b.	35
11. Espectros de DC UV-lejano asociados con los tipos de estructura secundaria.	54
12. Amplificación de gen enolasa de <i>H. pylori</i> (hpeno).	60
13. PCR en colonia de transformantes de <i>E. coli</i> DH5 α ™ con pGEM [®] -T Easy::hpeno.	61
14. Verificación de inserto hpeno en vectores por reacción de digestión.	62
15. Cromatograma de secuencia de inserto hpeno.	63
16. Fragmento de alineamiento entre las secuencias nucleotídicas del inserto hpeno y fragmento del genoma (gen <i>eno</i>) de <i>H. pylori</i> 26695.	64
17. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de inserto hpENO y de enzima enolasa de <i>H. pylori</i> 26695 (NCBI).	65
18. Cinética de expresión de hpENO en cepas de <i>E. coli</i>	66
19. Expresión estandarizada de hpENO en <i>E. coli</i> Rosetta-gami.	66
20. Obtención de proteínas de cuerpos de inclusión de <i>E. coli</i> Rosetta-gami.	67
21. Purificación de hpENO por cromatografía de afinidad y corte de tracto de histidinas.	68
22. Porcentaje de identidad de enolasa en género <i>Helicobacter</i> y en cepas de <i>H. pylori</i>	71
23. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de hpeno con homólogos de diferentes especies.	73

24. Espectros de DC en la región del UV lejano de apo-hpENO, obtenidos en tres soluciones amortiguadoras.	74
25. Estructura secundaria de apo y holo-hpENO en tris-HCl.	75
26. Estructura secundaria de apo y holo-hpENO en tris-acetato.	76
27. Estructura secundaria de apo y holo-hpENO en fosfatos de potasio.	77
28. Emisión de fluorescencia de apo-hpENO, obtenidos en tres soluciones amortiguadoras.	78
29. Emisión de fluorescencia de apo y holo-hpENO en tris-HCl.	79
30. Estructura terciaria de apo and holo-hpENO en tris-acetato.	80
31. Estructura terciaria de apo and holo-hpENO en fosfato de potasio.	81
32. Centro espectral de masas de espectros de fluorescencia de apo-hpENO y holo-hpENO.	82
33. Modelo de estructura de enolasa de <i>H. pylori</i> por homología.	83
34. Perfiles de desplegamiento térmico de apo y holo-hpENO, en tres soluciones amortiguadoras.	84
35. Recuperación de la estructura secundaria de apo y holo-hpENO después del desplegamiento térmico.	86
36. Cinéticas de des-plegamiento de holo-hpENO.	88
37. Gráfico de Eyring.	89
38. Determinación de actividad catalítica de hpENO.	90
39. Sitios-blanco de enolasa de <i>H. pylori</i>	91
40. Equiparación de estructura secundaria y terciaria de enolasa.	97
41. Desplegamiento térmico de enolasa de <i>H. pylori</i> y <i>S. cerevisiae</i>	99

LISTA DE SÍMBOLOS Y/ O NOMENCLATURA

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
θ_{MRW}	Elipticidad molar por residuo medio
ml	Mililitro
μ l	Microlitro
μ m	Micrómetro
2-PGA	2-fosfo-D-glicerato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
apo-hpENO	Proteína enolasa de <i>H. pylori</i> sin su grupo prostético (Mg^{2+})
DC	Dicroísmo circular
dNTP	Desoxirribonucleótidos-trifosfato
g	Gramos
holo-hpENO	Proteína enolasa de <i>H. pylori</i> con su grupo prostético (Mg^{2+})
hpENO	Proteína enolasa de <i>H. pylori</i>
hpeno	Gen de enolasa de <i>H. pylori</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank (Banco de datos de proteínas)
pH	Potencial de hidrógeno
PSP	PreScission Protease
rpm	Revoluciones por minuto

min	Minutos
s	Segundos
kDa	Kilodalton
UV lejano	Región ultravioleta (180-250 nm)
VC	Volumen de columna
V	Volt
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica).

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** que con su programa de Becas para Estudios de Posgrado, me brindo una beca para realizar mis estudios de Doctorado en una institución académica de excelencia.

Al **Instituto Politécnico Nacional**, por brindarme las herramientas necesarias para mí desarrollo académico, por contribuir a mi formación integral en el ámbito de la investigación y por beneficiarme con su programa Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) durante la duración de mis estudios.

Al **Centro de Biotecnológica Genómica** y a la **Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía** por facilitarme sus instalaciones durante el Doctorado, por asistir y potencializar mi desarrollo académico mediante la guía y apoyo de sus docentes. Especialmente a mis directores de tesis (Dr. Xianwu Guo y Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza) y a mi comité tutorial (Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez, Dr. Raymundo Rosas-Quijano, Dr. Gildardo Rivera Sánchez, Dra. Ana María Sifuentes Rincón y Dra. Claudia Patricia Larralde Corona).

RESUMEN

La enolasa es una enzima que participa en la vía clásica de la glucólisis de las células; esta enzima cataliza la conversión de 2-fosfo-D-glicerato en fosfoenolpiruvato. La enolasa es una enzima altamente conservada en todos los organismos, desde bacterias hasta humanos, lo que es un indicio de su importancia en las células. Aunado a esto, en la última década, se han descrito nuevas funciones para esta enzima, lo que ha llevado a que sea considerada como una proteína “moonlighting”, con más de una función. *Helicobacter pylori* es un patógeno humano común que causa enfermedades gástricas, incluso cáncer gástrico, sin embargo, la función de la enolasa de *H. pylori* (hpENO) no ha sido descrita en lo absoluto. En el presente proyecto se llevó a cabo un análisis de secuencia, estructural y bioquímico de la hpENO. El análisis de la secuencia de la hpENO; muestra la conservación de los sitios importantes para la catálisis (sitio activo, sitio de unión del sustrato y sitios de unión del cofactor), indicando que la hpEno debería ser capaz de llevar a cabo su función glucolítica. La enzima recombinante hpENO se sobreexpresó en *E. coli* Rosetta-gami y se purificó a partir de cuerpos de inclusión. En el análisis de estructura secundaria y terciaria de la hpENO los resultados (espectros de DC-UV lejano y de fluorescencia, obtenidos en tres soluciones buffer distintas: tris-acetatos, tris-HCl y fosfato de potasio, cada uno complementando) exponen algunas sutiles diferencias en las lecturas de θ_{MRW} y de intensidad de fluorescencia respectivamente de la apo y holo-hpENO en los tres tampones; sin embargo, en general podemos indicar que la hpENO reveló espectros característicos de una proteína plegada (con estructura secundaria y terciaria), similares a los espectros reportados para la enolasa de otras especies. Asimismo, la hpENO mostró diferentes perfiles de desplegamiento térmico y de efecto estabilizador de su cofactor propios de cada tampón. Adicionalmente, estudiamos la cinética de la reacción de desplegamiento y calculamos la entalpía de activación para la hpENO. En la comparación de la hpENO con la enolasa de otras especies, la hpENO muestra características similares de estructura secundaria y terciaria, así como de la reacción de

plegamiento/desplegamiento. Particularmente la entalpía de activación asociada con la reacción de desplegamiento térmico, cuyo valor para la hpENO fue muy similar a la de la enolasa de levadura, lo que sugiere que estas comparten un camino de plegamiento similar y estabilidad cinética. Sin embargo, aún bajo un gran número de condiciones experimentales evaluadas, la actividad enzimática de hpENO no pudo detectarse, lo que implica que esta proteína no tiene una función glucolítica en *H. pylori*. Este hallazgo es consistente con los experimentos previos sobre la oxidación de la glucosa a través de la vía Entner-Doudoroff y la ausencia en el genoma de un conjunto de enzimas necesarias para la glucólisis. Los resultados revelan nuevas características de hpENO.

ABSTRACT

Enolase, which catalyses the conversion of 2-phospho-D-glycerate to phosphoenolpyruvate, is an important enzyme in the classic glycolysis pathway in cells. Enolase is highly conserved in organisms from bacteria to humans, indicating its importance in cells. Thus, enolase is a good target for developing new drugs. In the last decade, new functions of this enzyme have been found. *Helicobacter pylori* is a common human pathogen that causes gastric diseases, even gastric cancer. In this study, the sequence of *H. pylori* enolase (hpENO) was analysed; the conservation (at least partial) of binding sites for cofactor, plasminogen and host extracellular RNA, as well as catalytic site indicate that HpEno should be capable of performing the functions. Recombinant hpENO was overexpressed and purified from *E. coli*. Compared to the enolases from other species, hpENO had similar characteristics for its secondary structure. The temperature-induced profiles indicate that hpENO is quite stable to temperature, compared to other homologs. Regarding the kinetics of the unfolding reaction, we found that the activation enthalpy associated with the thermal unfolding reaction, is equivalent to the reported activation enthalpy for yeast enolase, indicating a similar scaffold and kinetic stability. Although a wide range of experimental conditions were assayed, no any enzymatic activity of hpENO was detected. This finding is consistent with previous experiments on the oxidation of glucose through the Entner-Doudoroff pathway and the absence in the genome of a set of enzymes necessary for glycolysis, which implies that this protein does not have a glycolytic function in *H. pylori* cell. To prove the lack of activity, still a much wider range of experiments should be carried out. The results reveal new characteristics of hpENO and shed new light on the function of proteins in bacteria with a reduced genome.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Género *Helicobacter*

El nombre del género *Helicobacter* deriva del griego hélix que significa “espiral” (Stephen LW On et al. 2005). Este género fue establecido en 1989 después de una reclasificación de bacilos Gram-negativos que pertenecían al Género *Campylobacter*, esta re-organización fue realizada debido múltiples diferencias morfológicas, bioquímicas y genéticas presentadas por estos bacilos. Sin embargo, no todas las especies del nuevo género *Helicobacter* provenían del género *Campylobacter*, muchas de ellas fueron especies recientemente descubiertas (Owen 1998).

El género *Helicobacter* está formado por un grupo de organismos que colonizan la mucosa gastrointestinal de los seres humanos y una variedad de especies animales. Las últimas revisiones de taxonomía del género *Helicobacter* enumeran 22 especies validadas para este género; 6 especies aisladas de tejido gástrico y 16 especies enterohepáticas. Así mismo presentan una creciente lista de cepas candidatas aun no validadas (Solnick et al. 2006; Solnick and Vandamme 2001). El **Cuadro 1** muestra las especies validadas del género *Helicobacter*. Sin embargo, a la fecha la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) muestra alrededor de 50 especies para el género *Helicobacter*.

Las bacterias pertenecientes al género *Helicobacter* comparten ciertas características bioquímicas y morfológicas entre las que podemos destacar las siguiente; son bacterias Gram-negativas, no formadoras de esporas, poseen una morfología celular curva, espiral, o fusiforme, tienen un diámetro que va de 0.2 a 1.2 μm y un tamaño de 1.5 a 10.0 μm (Dewhirst et al. 2000).

El género *Helicobacter* agrupa especies bacterianas que infectan el moco superficial, el cual recubre los epitelios del tracto gastrointestinal de humanos y animales, como *H. felis*, *H. acinonychis* y *H. pylori* (Solnick and Vandamme 2001). Esta última es la especie más estudiada del género *Helicobacter* esto debido a su predilección

por infectar el tracto gastrointestinal de humanos y su correlación con el desarrollo de diferentes enfermedades del tracto gastrointestinal.

Cuadro 1. Especies del género *Helicobacter*.

Taxón	Hospedero	Cepa	No. de acceso de GenBank	Referencia
<i>Helicobacter de tejido gástrico</i>				
<i>H. acinonychis</i>	Leopardo	ATCC 51101	M88148	Eaton et al., 1993
<i>H. bizzozeronii</i>	Perro	CCUG 35545	Y09404	Hanninen et al., 1996
<i>H. felis</i>	Gato, perro	ATCC 49179	M37642	Paster et al., 1991
<i>H. mustelae</i>	Hurón	ATCC 43772	M35048	Fox et al., 1988, Goodwin et al., 1989
<i>H. pylori</i>	Humano, macaco	ATCC 43505	M88157	Goodwin et al., 1989
<i>H. salomonis</i>	Perro	CCUG 37845	U89351	Jalava et al., 1997
<i>Helicobacter enterohepático</i>				
<i>H. aurati</i>	Hámster	ATCC BAA-1	AF297868	Patterson et al., 2000
<i>H. bilis</i>	Raton, perro y humano	ATCC 51630	U18766	Fox et al., 1995
<i>H. Canadensis</i>	Humano	ATCC 700968	AF262037	Fox et al., 2000
<i>H. canis</i>	Perro y humano	ATCC 51401	L13464	Stanley et al., 1993
<i>H. cholecystus</i>	Hamster	ATCC 700242	U46129	Franklin et al., 1996
<i>H. cinaedi</i>	Humano, hámster y mono	CCUG 18818	M88150	Totten et al., 1985 Vandamme et al., 1991
<i>H. fennelliae</i>	Humano	ATCC 35684	M88154	Totten et al., 1985 Vandamme et al., 1991
<i>H. ganmani</i>	Ratón	CCUG 43526	AF000221	Robertson et al., 2001
<i>H. hepaticus</i>	Ratón	ATCC 51448	U07574	Fox et al., 1994
<i>H. mesocricetorum</i>	Hámster	ATCC 700932	AF072471	Simmons et al., 2000
<i>H. muridarum</i>	Ratón y rata	ATCC 49282	M80205	Lee et al., 1992
<i>H. pametensis</i>	Pájaro y cerdo	ATCC 51478	M88147	Dewhirst et al., 1994
<i>H. pullorum</i>	Pollo y humano	ATCC 51801	L36141	Stanley et al., 1994
<i>H. rodentium</i>	Ratón	ATCC 700285	U96296	Shen et al., 1997
<i>H. trogontum</i>	Rata	ATCC 700114	U65103	Mendes et al., 1996
<i>H. typhlonius</i>	Ratón	MU96-1	AF061104	Fox et al., 1999, Franklin et al., 1999

Tomado de Solnick et al., 2006 (Solnick et al. 2006)

1.2 *Helicobacter pylori*

En 1983 Barry James Marshall y John Robin Warren describen a *H. pylori* y relacionan su infección con el desarrollo de úlceras por primera vez. Esta publicación fue muy controvertida, pero, finalmente aceptada una vez que se logró el aislamiento de la bacteria y se demostró que dicho microorganismo cumplía los postulados de Koch, ya que al ser ingerido se provocaba una gastritis (Marshall and Warren 1984; Warren and Marshall 1983).

En un inicio Marshall sugiere el nombre formal de *Campylobacter pyloridis* para esta bacteria (Marshall et al. 1987), sin embargo, en 1987 después de una corrección gramatical cambian el nombre a *Campylobacter pylori* apareciendo así en las posteriores publicaciones científicas. Estudios posteriores de secuenciación de la región 16S del RNA ribosómico demostraron que la especie conocida como *Campylobacter pylori* era distinta de las especies de *Campylobacter* descritas hasta entonces, por lo que en 1989 se adoptó el nuevo género denominación de *Helicobacter*, pasando a denominarse *Helicobacter pylori* (Luning 1989).

1.2.1 Morfología

Helicobacter pylori es una bacteria fastidiosa, Gram-negativa y microaerofílica, esta bacteria se caracteriza por su morfología curvada en forma de S. Su longitud oscila entre 2.5 a 5 μm y su diámetro es de alrededor de 0.5 μm , sin embargo esta longitud de onda en espiral puede variar con la edad, las condiciones de crecimiento y la identidad de las especies de las células (Robinson et al. 2017; Solnick and Vandamme 2001). En la **Figura 1** se puede apreciar una fotografía al microscopio con la morfología característica de la bacteria *H. pylori*.

En cuanto a la forma celular de la bacteria algunos autores han asociado su morfología de espiral (similar a la forma de un sacacorchos) al hábitat natural de la bacteria, mientras que la morfología cocoide la relacionan con los cultivos viejos o sometidos a situaciones no favorables para la bacteria (hábitats menos óptimos) (Andersen and Wadstrom 2001; Azevedo et al. 2007a).

H. pylori posee de 2 a 6 flagelos monopolares, estos son fundamentales para su movilidad. Sus flagelos están recubiertos por una estructura lipídica, que parece tener la misión de proteger a los flagelos de degradación debida al medio ácido (Amieva and El-Omar 2008).

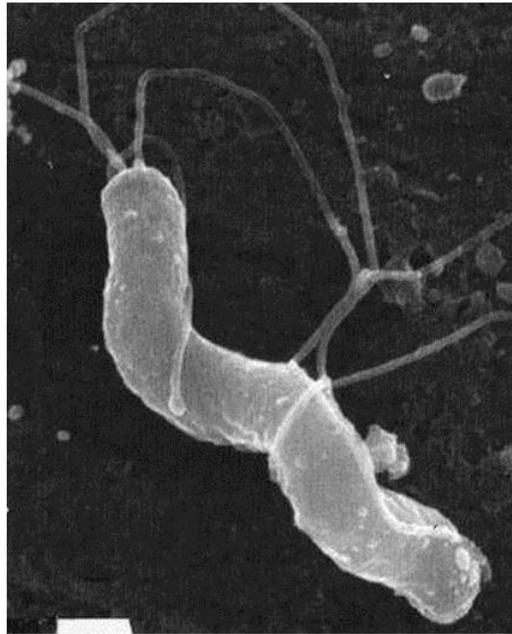


Figura 1. Morfología de *Helicobacter pylori*.

Emisión de campo SEM, bar = 0.5 μm
(Mobley et al. 2001)

Es generalmente aceptado que la temperatura óptima de crecimiento de *H. pylori* corresponde a 37 °C, aunque también se lleva a cabo un crecimiento normal en el rango de 35 a 39 °C. Es un organismo microaerófilo que requiere para su crecimiento una atmósfera con las siguientes características: 5-10% de O₂, 5-10% de CO₂ y 80-90% de N₂, así como de una humedad del 90-95%. Para su cultivo en el laboratorio se requiere de medios suplementados con suero o sangre entre el 5% y 10%, y una incubación de hasta 10 días (On et al. 2005).

Aproximadamente la mitad de las cepas de *H. pylori* portan un plásmido, el tamaño de estos plásmidos varían entre 1.5 a 40 kbp, sin embargo, las funciones de estos plásmidos aún no se conocen. En general las cepas con o sin plásmido no muestran

diferencias en el patrón de resistencia a los antibióticos, así mismo no hay evidencia de la presencia de plásmidos conjugacionales (Goodwin and Armstrong 1990).

1.2.2 Diversidad genética

H. pylori tiene una alta diversidad genómica, esta diversidad ha sido ya confirmada mediante técnicas moleculares, tales como; la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (conocida por el acrónimo inglés RAPDs), la tipificación multilocus de secuencias (conocida por el acrónimo inglés MLST) y la electroforesis en gel de campo pulsado (conocida por el acrónimo inglés FGE) (Suerbaum and Josenhans 2007). En la actualidad se encuentran secuenciados 133 genomas de *H. pylori*, los cuales se encuentran disponibles en la base de datos del NCBI. Haciendo un rápido análisis observamos que el tamaño del genoma de *Helicobacter pylori* oscila de unas cepas a otras entre 1.5 a 1.7 Mb, mientras que su contenido de G/C se encuentra entre el 38-39%. Estos rangos coinciden con los dos primeros genomas de cepas *H. pylori* secuenciados; 26695 y J99 (Alm and Noonan 2001).

H. pylori ha sido considerada como una de las especies bacterianas más variables genéticamente, esta variabilidad de las cepas se ha asociado a diversos factores, incluyendo: la acumulación progresiva de mutaciones puntuales a lo largo del tiempo, el reordenamiento intragenómico, la transposición y la transferencia horizontal de genes, entre otros (Falush et al. 2001; Fu et al. 2014). La diversidad de las secuencias de DNA de *H. pylori* de diferentes zonas geográficas, dada la estrecha relación que ha existido entre esta bacteria y el humano desde hace aproximadamente 11,000 años, ha sido relacionada también con factores como la migración y la asociación de las razas humanas (Covacci et al. 1999). En estudios de secuencias de ADN de cepas de *H. pylori* aisladas de personas con diferentes nacionalidades, fue posible identificar siete poblaciones (distintos orígenes geográficos) de cepas, dichas poblaciones exponen las migraciones humanas desde África hacia el resto del mundo en un periodo de 58,000 años aproximadamente (Falush et al. 2003).

1.2.3 Epidemiología

La humanidad ha sido infectada por *H. pylori* desde la antigüedad, estudios sobre el análisis de secuencias genéticas, sugieren que los seres humanos habrían estado

infectados por el *Helicobacter pylori* desde que el hombre migró de África, estos datos estiman que *H. pylori* ha permanecido íntimamente asociada con las poblaciones de huéspedes humanos desde hace aproximadamente más de 58,000 años (Linz *et al.* 2007).

Desde su polémico descubrimiento, la infección de *H. pylori* se ha asociado con enfermedades como gastritis crónica y úlcera duodenal o gástrica (Marshall and Warren 1984; Warren and Marshall 1983), además la infección por *H. pylori* aumenta significativamente el riesgo de cáncer gástrico, se estima que *H. pylori* es responsable de aproximadamente el 90% cáncer gástrico (Moss 2017). Sin embargo, la mayoría de los casos de infección de *H. pylori* son asintomáticos, sólo entre un 10 y 15% de los individuos infectados sufren de úlcera péptica y del 1 al 3% desarrolla cáncer gástrico (Varon *et al.* 2009).

Actualmente se estima que la infección por *H. pylori* afecta a más de la mitad de la población mundial, aunque existe una amplia variación en la prevalencia de *H. pylori* entre regiones y países. En África se presenta una prevalencia de 79.1% (siendo esta la prevalencia más alta a nivel mundial), en América Latina y el Caribe se estima una prevalencia estimada de 63.4%, mientras que en Asia se presenta una prevalencia de infección de 54.7%, en contraste, en América del Norte y Oceanía se presentan las prevalencias de infección de *H. pylori* más bajas con valores estimados de 37.1% y 24.4% respectivamente (Hooi *et al.* 2017). En la **Figura 2** se presenta el mapa global de prevalencia de infección con *H. pylori*.

Con los datos la prevalencia y distribución de infección de *H. pylori* puede intuirse que la infección con esta bacteria se encuentra vinculada con el grado de desarrollo económico de cada país. A inicios del siglo XXI, la prevalencia de *H. pylori* disminuyó en los países altamente industrializados, mientras que en los países en desarrollo y los países recientemente industrializados la prevalencia no sufrió cambio alguno. Estas diferencias en la prevalencia probablemente son reflejo del nivel de urbanización, saneamiento, acceso a agua potable y nivel socioeconómico (Awuku *et al.* 2017; Hooi *et al.* 2017; Ramirez-Ramos and Sanchez-Sanchez 2009).

Existen dos modelos de colonización de *H. pylori*: en el primero de ellos se caracteriza por una tasa de infección alta durante la infancia temprana; mientras que en

el segundo se identifica por un nivel de prevalencia bajo en la niñez, junto con un incremento gradual en función de la edad. La colonización de *H. pylori* al igual que la prevalencia de la infección también se relaciona con el nivel socioeconómico del país, en los países en desarrollo es característico del primer patrón de colonización, es decir, la infección se adquiere a edades más tempranas (antes de los 3 años) y continúa toda la vida en la ausencia de tratamiento (Robinson et al. 2017), en cambio en las regiones industrializadas de Europa, América del Norte y Oceanía el segundo patrón de colonización es el más común (Awuku et al. 2017; Bruce and Maaros 2008; Ramirez-Ramos and Sanchez-Sanchez 2009; Robinson et al. 2017).

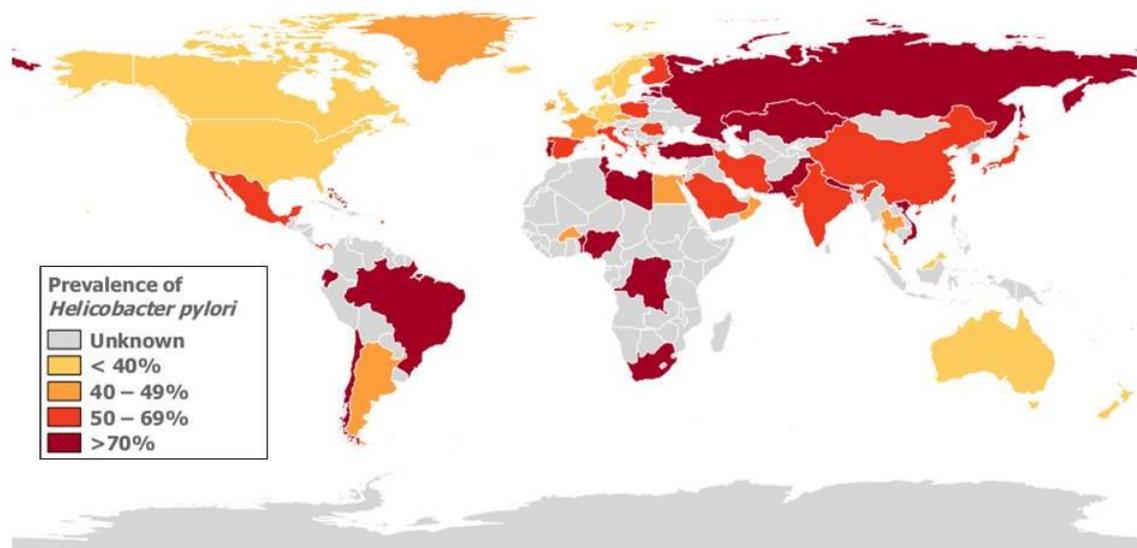


Figura 2. Mapa global interactivo de prevalencia de *Helicobacter pylori*.

Imagen tomada de URL: <https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html>

Fecha de consulta: 14 de enero de 2018

Aunque aún no es reconocido un modo definitivo de transmisión de la infección, se ha postulado que ésta puede ocurrir de persona–persona por las vías: gastro-oral, oral-oral y fecal-oral. Debido a que *H. pylori* ha sido encontrada con frecuencia en el vómito de personas infectadas, así mismo también se ha aislado de saliva y de heces, algunos autores consideran a la transmisión persona-persona el principal mecanismo de propagación de la bacteria, principalmente dentro del núcleo familiar (Brown 2000). Sin

embargo, al igual que en los porcentajes de prevalencia de la infección, los mecanismos de propagación también presentan patrones diferentes dependiendo del grado de desarrollo del país. En los países desarrollados el mecanismo de contagio más frecuente podría ser por contacto interpersonal directo vía oral-oral, mientras que en los países en vías de desarrollo predominaría la ruta fecal-oral. La tasas elevadas de prevalencia y de reinfecciones se asocian con la falta de infraestructuras sanitarias, el hacinamiento, los bajos estándares socioeconómicos y educativos del país (Ahuja and Sharma 2002; Awuku et al. 2017; Azevedo et al. 2007b; Brown 2000).

Por otro lado, también se habla de otras vías de transmisión como: transmisión zoonótica o por vectores, debido al aislamiento de *H. pylori* de gatos (Fox et al. 1996), monos, cerdos (Fox 1995), ovejas, perros (Dore et al. 1999) y moscas (Grubel et al. 1998), no obstante, no se ha demostrado que ninguno de estos organismos tengan un papel importante en la transmisión de *H. pylori*; transmisión a base de agua, debido a la contaminación fecal, especialmente en las partes del mundo en las que el agua no tratada es común (Adams et al. 2003; Hazell et al. 1994; Sasaki et al. 1999); transmisión iatrogénica, debido a que las pinzas de biopsia típicamente penetran en la mucosa gástrica y son difíciles de limpiar (Kotera et al. 1993; Tytgat 1995).

1.2.4 Tratamiento

Actualmente, los tratamientos que ofrecen una mayor eficiencia son varios; En general se sugiere la combinación de un supresor potente del ácido gástrico y tratamientos cuádruples, con una duración de hasta 14 días para todos los tratamientos empíricos de primera línea y de rescate. Los últimos hallazgos resaltan la importancia del empleo de un medicamento altamente eficiente en la supresión acida del estómago (que lleve a cabo la modificación del pH), ya que esto contribuye a incrementar la eficiencia de los antibióticos empleados (Molina-Infante et al. 2017) (Alarcon et al. 1999). En el margen de los nuevos medicamentos incluidos en el tratamiento de *H. pylori* resalta el Vonoprazán, un potente anti-secretor que actúa inhibiendo la unión del potasio a la bomba de protones en la célula parietal gástrica (Molina-Infante et al. 2017), esto a raíz de recientes estudios en donde se demostró que Vonoprazan es muy eficaz en

la terapia triple de primera línea (obteniendo una eficiencia de tratamiento de 92.6%) y como parte de la terapia triple de segunda línea (con una eficiencia de 98%) en pacientes positivos con *H. pylori* con úlcera gástrica o duodenal (Murakami et al. 2016). Por otro lado, también se recomienda el tratamiento en el que se reintegra a el subcitrato de bismuto a regímenes triples (un inhibidor de la bomba de potasio, amoxicilina y bien claritromicina, metronidazol, levofloxacino o rifabutina), así mismo se sugiere la combinación del inhibidor de la bomba de potasio, el bismuto y dos antibióticos (amoxicilina, metronidazol, tetraciclina o furazolidona), estos tratamientos han demostrado incrementar las tasas eficiencia por arriba del 90% y ser altamente eficaces frente a cepas multirresistentes de *H. pylori* (Molina-Infante et al. 2017).

En el fracaso del tratamiento pueden intervenir componentes; factores propios del tratamiento (dosis inadecuadas, duración incorrecta y/o el tipo de medicamento de elección), factores del paciente (falta de adherencia al tratamiento) o factores del microorganismo. Entre los factores del microorganismo los más trascendentes son; las características particulares de la cepa y la resistencia a los antibióticos. Es por ello que siempre es recomendable que antes de iniciar una pauta de tratamiento se cuente con información referente al porcentaje de resistencia a los antimicrobianos en esa población o área geográfica. O bien evaluar la resistencia a los antibióticos a emplear previo a la administración del tratamiento, con la idea de que se manden solo a aquellos a los que sean susceptibles, si bien somos conscientes de que este método no es del todo práctico o viable en la actualidad esto resultaría en una eficiencia mayor del tratamiento (Alarcon et al. 1999; Graham and Shiotani 2008; Megraud 2012).

1.2.5 Resistencia bacteriana

Helicobacter pylori es muy susceptible a la mayoría de los antibióticos en los estudios *in vitro*, sin embargo, cuando se usan en el contexto clínico, no se obtiene la erradicación esperada. Las tasas de resistencia a los antibióticos en una población están determinadas por varios factores como: la tasa de mutación, la tasa de uso de antibióticos y el tamaño de la población (Bjorkholm et al. 2001). Como es de esperarse, el porcentaje de resistencia a cada uno de los antibióticos empleados en el tratamiento varía de un país a otro. Por ejemplo, la resistencia al metronidazol tienen los porcentajes

de resistencia más altos en los países en desarrollo (80-90% en África), en cambio el porcentaje de resistencia a la claritromicina es mucho más baja, generalmente por debajo del 10% (Aларcon et al. 1999). En la **Figura 3** se muestra las tasas de resistencia de *H. pylori* a los antibióticos usados en su tratamiento presentadas por Wu y colaboradores en 2012.

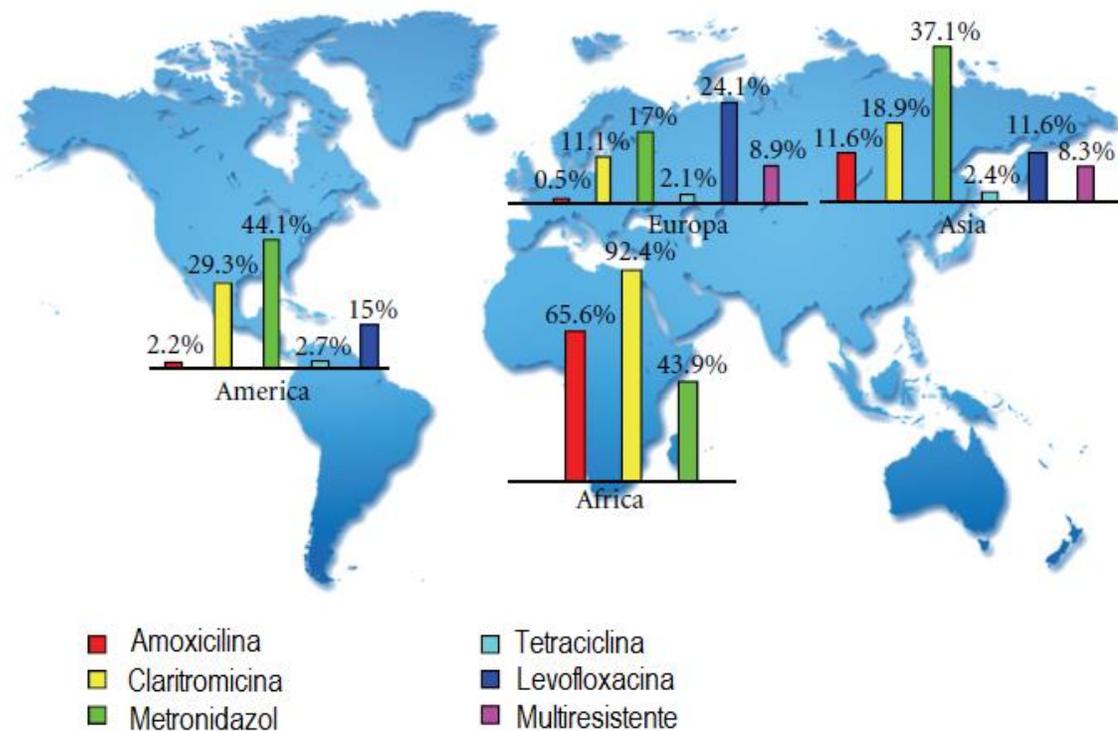


Figura 3. Tasas de resistencia a los antibióticos en diferentes zonas continentales.

(Wu et al. 2012)

La resistencia en bacterias, pueden ser principalmente de dos clases: la resistencia natural y la resistencia adquirida. La resistencia natural (o primaria), originada por la imposibilidad propia del antibiótico para suprimir la infección, es mayormente debida a la imposibilidad del compuesto para penetrar. En cambio, la resistencia adquirida es aquella que las bacterias desarrollan a medicamentos a los que inicialmente eran susceptibles. Este último tipo de resistencia puede ser originada por mutaciones genéticas, o a la transferencia de plásmidos. En las cepas de *H. pylori* se habla además de otro tipo de resistencia; la resistencia farmacológica, en esta la bacteria

muestra susceptibilidad al antibiótico *in vitro*, mientras que *in vivo* son resistentes; la origen de este tipo de resistencia es la dificultad del antibiótico de llegar al punto de la infección o bien el uso de una concentración insuficiente (Pajares Garcia et al. 2007; Wu et al. 2012).

1.2.5.1 Búsqueda de dianas para el diseño de fármacos

Este problema creciente de resistencia a los antibióticos hace primordial la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos que den lugar a nuevos antibióticos que puedan ser usados de manera efectiva y segura en el control de la infección por *H. pylori*. En el diseño de inhibidores de los blancos farmacológicos, la técnica mas utilizada es la búsqueda de moléculas que compiten por el sitio activo de la molécula blanco. Sin embargo, en muchas enzimas, como el alto grado de conservación del sitio activo representa una dificultad en la selectividad del inhibidor. En estos casos se sigue, otra estrategia, que consiste en guiar el diseño de fármacos en diferencias estructurales, que conlleven a la disociación de la estructura oligomérica de las proteínas (Perez-Montfort et al. 2002).

Por ejemplo, las enzimas de la ruta de la glucólisis se reconocen como blanco para el desarrollo de nuevos fármacos anti-tripanosomas, ya que esta vía desempeña un papel primordial en el suministro de ATP. Los conocimientos adquiridos a partir de la caracterización de los mecanismos estructurales y catalíticos han sido aplicados en el desarrollo de compuestos que inhiben selectivamente a las enzimas glucolíticas de los parásitos sin afectar las proteínas correspondientes del huésped humano (Verlinde et al. 2001). Así mismo, otros estudios identificaron a la enolasa (enzima de la ruta de la glucólisis) de *Mycobacterium tuberculosis* con el objetivo de una serie de compuestos de 2-aminotiazoles con propiedades antimicobacterianas, esto sugiere que el desarrollo de inhibidores selectivos de la enolasa micobacteriana podrían ser una herramienta eficaz para combatir la tuberculosis (Wescott et al. 2018).

2.1 Enolasa

La presencia ubicua del gen de la enolasa y su homología de secuencia aun entre organismos pertenecientes a diferentes filos, sugieren que el gen de la enolasa proviene de un antecesor común y que éste se ha diversificado gracias a la especiación de los organismos y a la duplicación de genes dentro de los organismos (Avilan et al. 2011; Day et al. 1993). La traducción del gen de la enolasa resulta en una proteína cuyo número de aminoácidos fluctúa alrededor de los 400-450, dando así una proteína de un peso molecular de aproximadamente 40-45 KDa.

La enolasa es una enzima que cataliza la deshidratación de 2-fosfo-D-glicerato (2-PGE) a fosfoenolpiruvato (PEP) en la vía de la glucólisis y en sentido opuesto durante la gluconeogénesis, tanto para llevar a cabo estas reacciones catalíticas como para la misma estabilidad de su estructura la enzima requiere de magnesio como cofactor, es por ello que está clasificada como una metaloenzima (Lebioda and Stec 1991). Además de su función metabólica, la enolasa ha sido implicada por su contribución a varios procesos biológicos y patofisiológicos (Chauhan et al. 2012; Diaz-Ramos et al. 2012; Henderson and Martin 2013). Sin embargo, a la fecha no existen informes sobre la enolasa *H. pylori*, referentes a la obtención de la proteína recombinante, su estructura o función. Es por ello que en este trabajo se llevó a cabo la obtención de la proteína recombinante enolasa de *H. pylori*, para su posterior caracterización; estructural, biofísica y bioquímica.

2. ANTECEDENTES

2.2.1 Estructura primaria de enolasa

La traducción de este gen *eno* da como resultado a la proteína enolasa cuya extensión varía entre 400-450 aminoácidos, obteniéndose así un peso molecular estimado entre los 40 y 50 KDa aproximadamente.

Dentro de la secuencia de la proteína enolasa se han identificado aminoácidos y sitios claves para la función catalítica de la enzima, entre ellos se encuentran los sitios de unión a su cofactor, un catión divalente comúnmente Mg^{2+} que le ayuda a llevar a cabo su función catalítica. La propuesta más aceptable es que la enolasa posee al menos dos sitios de unión a Mg^{2+} . Uno de ellos se conoce como el "sitio conformacional": cuando Mg^{2+} se une a este dominio, induce cambios conformacionales en el sitio activo que permite la unión de una molécula de sustrato o sus análogos. Posteriormente se une el segundo Mg^{2+} a la segunda posición conocido como el "sitio catalítico" y contribuye como componente del aparato catalítico (Poyner et al. 2001; Wold and Ballou 1957). Sin embargo, otros autores hablan de un tercer de unión para el Mg^{2+} , el sitio III llamado "sitio inhibitorio" (da Silva Giotto et al. 2003; Faller et al. 1977; Pal-Bhowmick et al. 2007).

Los aminoácidos de la enolasa de levadura importantes para llevar a cabo la catálisis han sido descritos a detalle (Larsen et al. 1996; Zhang et al. 1997), y se encuentran disponibles en la base de datos de Unitprot. En el **Cuadro 2** se resumen los aminoácidos y su papel dentro de la función catalítica de la enzima enolasa de levadura.

2.2.2 Obtencion de enolasa recombinante

Con ayuda de las técnicas de biología molecular en los últimos años la producción y caracterización de proteínas recombinantes se ha incrementado. Estos trabajos han permitido caracterizar más eficientemente proteínas de interés, como la enolasa. Una de las primeras enolasa recombinantes estudiadas fue la enolasa de *Candida*

albicans, el producto polipeptídico del cDNA clonado fue empleado para la transformación de células de *E. coli* DH5 α resistentes a ampicilina, la purificación de la proteína recombinante fue lograda mediante su fusión con la glutatión S-transferasa. La obtención de la enolasa recombinante *C. albicans* permitió caracterizar su estructura secundaria y su actividad enzimática (Sundstrom and Aliaga 1992).

Cuadro 2. Aminoácidos de importancia catalítica para la enolasa de levadura.

Aminoácido	Posición	Función	Acción
Histidina (H)	160	Sitio de unión	Substrato
Glutámico (E)	169	Sitio de unión	Substrato
Glutámico (E)	212	Sitio activo	Donador de protón
Aspártico (D)	247	Unión de Metal	Magnesio
Glutámico (E)	296	Unión de Metal	Magnesio
Glutámico (E)	296	Sitio de unión	Substrato
Aspártico (D)	321	Unión de Metal	Magnesio
Aspártico (D)	321	Sitio de unión	Substrato
Lisina(K)	346	Sitio activo	Aceptor de protón
Lisina(K)	397	Sitio de unión	Substrato

Información rescatada de Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/P00924>)

El gen que codifica para la enolasa de *S. pyogenes* fue clonado e insertado en el plásmido pET-14b (con tracto de histidina), células de *E. coli* BL21 (DE3) fueron empleadas para la expresión de la proteína recombinante, fue necesario emplear técnicas de mutagénesis para modificar dos residuos que diferían de la secuencia reportada. Se empleó caldo Luria con ampicilina para el crecimiento de las células transformadas, las células se crecieron a 37°C y la producción de la proteína recombinante fue inducida con 0.5 mM de IPTG durante 4 horas a 29 °C, finalmente la proteína fue purificada en una columna de níquel a partir del sobrenadante celular. La obtención de la proteína recombinante de *S. pyogenes* permitió determinar la estructura cuaternaria de esta proteína, elucidar su estructura secundaria y los factores relacionados con su disociación oligomérica (Karbassi et al. 2010). Esta misma técnica de purificación fue empleada en la obtención de la α -enolasa de *S. pneumoniae*; el gen de la enolasa de esta bacteria fue amplificado y ligado en el vector de expresión pQE30 (con tracto de

histidinas en el extremo N-terminal), células de *E. coli* M15 fueron transformadas para la expresión de la proteína recombinante (Bergmann et al. 2001).

Posteriormente el gen que codifica para la enolasa de *B. abortus* A19 fue clonado, secuenciado y la proteína recombinante se expresó en células de *E. coli* BL21; posteriormente la proteína se purificó mediante un tracto de histidinas añadido a la proteína recombinante. La enolasa recombinante de *B. abortus* A19 fue empleada para la determinación de la actividad enzimática, así como la elucidación del papel de esta enzima relacionada a la patogénesis de *B. abortus* (Han et al. 2012).

En la producción de proteínas recombinantes siempre es deseable la obtención de la proteína de interés en el sobrenadante celular, pero esto no siempre es posible, en muchas ocasiones la expresión de proteínas recombinantes resulta en la acumulación de agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión. Sin embargo, la obtención de proteína en cuerpos de inclusión no es un impedimento para su purificación y posterior caracterización. Existen reportes de la obtención exitosa de la enolasa recombinante a partir de cuerpos de inclusión, uno de estos trabajos es el concerniente a la caracterización de la enolasa recombinante de *Xylella fastidiosa*. En el cual el gen que la codifica fue amplificado y clonado empleando el kit pGEMT System II (Promega); posteriormente células de *E. coli* DH10B fueron transformadas por electroporación (Bio Rad Gene Pulser II), posterior a la verificación del inserto el gen fue sub-clonado en el vector de expresión pET 3a, y nuevamente por electroporación fueron transformadas células de *E. coli* BL21 (DE3) pLYS-S. Las células se crecieron en caldo 2xTY con antibiótico y la expresión de la proteína recombinante fue inducida con 0.4 mM de IPTG. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron utilizando urea y se empleó una columna de CM-Sephadex. La enolasa recombinante de *X. fastidiosa* fue empleada para la determinación de la actividad catalítica de la proteína y su posterior comparación con la enolasa nativa de *X. fastidiosa* (Facincani et al. 2003). Unos años más tarde de manera similar la enolasa de *Curvularia lunata* se expresó en *E. coli*, y se purificó a partir de cuerpos de inclusión con un rendimiento de 0.5 mg/L, posterior a su purificación la enolasa recombinante fue empleada para estimar la actividad enzimática y para analizar su reactividad inmunológica como alérgeno.

Previo a este proyecto no existe reporte alguno de la obtención de la enolasa recombinante de bacterias pertenecientes al género *Helicobacter*.

2.2.3 Estructura secundaria y terciaria de enolasa

La enolasa de levadura es la enzima del grupo mejor caracterizada, su estructura fue la primera en describirse. Cada monómero de la enolasa de levadura está conformado por dos dominios principales. El dominio C-terminal que presenta un plegamiento de ocho cadenas α/β -barril, con el sitio activo cerca del extremo C-terminal de este barril, mientras que el dominio N-terminal, tiene una estructura de tres cadenas β -hojas anti paralelas, seguidas de cuatro cadenas α -hélices, se pliega por fuera del dominio principal (Lebioda et al. 1989). Posterior a este primer reporte ha surgido un gran número de descripciones de estructuras secundarias de otras proteínas enolasa, por ejemplo, la enzima enolasa de *Enterococcus hirae*, y la α -enolasa de humano; cuyas descripciones de estructura secundaria de la enzima son idénticas a la de levadura (Hosaka et al. 2003; Kang et al. 2008). Es relevante mencionar que en el caso de los mamíferos la enolasa se presenta en tres isoformas llamadas α , β y γ enolasa (Kornblatt 2005).

Otras estructuras secundarias importantes en la función catalítica de la enolasa son tres regiones conocidas como bucles (numerados como 1, 2 y 3). Estos bucles se suscitan cambios estructurales en importantes en estas tres regiones de la enzima, dichos cambios se llevan a cabo posteriormente a la unión del ligando y del segundo Mg^{2+} , y dan lugar a la conformación activa (o cerrada) de la enzima (Kang et al. 2008). Por ejemplo, en la enzima enolasa de *T. brucei* cuando el sustrato (o el producto) y dos iones metálicos están unidos a la enzima, los tres bucles se mueven sobre el sitio catalítico produciendo la conformación "cerrada" de la enzima (da Silva Giotto et al. 2003).

La obtención de información referente a la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas de las proteínas tradicionalmente se había obtenido a partir de la técnica de difracción de rayos X, sin embargo, esta técnica requiere de una gran cantidad de proteína para lograr cristales de buena calidad, así mismo la obtención misma de dichos cristales es pocas veces exitosa. Es por ello que se ha difundido el empleo de nuevas técnicas, en las que requieren menos cantidad de proteína. Técnicas

como el dicroísmo circular y la espectroscopia de fluorescencia, estas técnicas son esenciales para el análisis de la estructura secundaria y de la estructura terciaria de las proteínas respectivamente.

Mediante la técnica de dicroísmo circular (DC) ha sido posible caracterizar las estructuras secundarias y terciarias de la enolasa, así como también ha permitido la describir el proceso de disociación del estado oligomérico de la proteína y estudiar su relación con la estabilidad catalítica y estructural de la enolasa. Por otro lado, los espectros de emisión de fluorescencia han permitido caracterizar las interacciones y modificaciones de la estructura terciaria de las proteínas en un medio ambiente acuoso.

La caracterización de las enolasas de tres especies: *Plasmodium falciparum*, levadura y músculo de conejo a partir de DC mostró una correlación entre altas concentraciones de imidazol y la disociación del dímero de la enolasa de *P. falciparum* en monómeros activos, este efecto resultaba maximizado en pH bajos. En la enolasa de músculo de conejo y de levadura también se lleva a cabo la disociación del dímero en presencia de imidazol, sin embargo, en estas proteínas el Mg (II) ejercía un efecto de protección en la disociación. Los espectros de DC de formas monoméricas y dimericas de la enolasa de *P. falciparum* y levadura fueron muy similares, revelando así que la disociación de los dímeros para formar monómeros, involucra únicamente una ligera disminución en el contenido helicoidal y en un aumento en el contenido de la lámina beta. En la Figura 4. Espectros de dicroísmo circular de enolasa de *P. falciparum* y levadura. **Figura 4** se muestra los espectros de DC reportados para las enolasas de *P. falciparum* y levadura (Pal-Bhowmick et al. 2007) (Zhao et al. 2008).

En un proyecto similar se examinó el proceso de disociación de la enolasa octamérica de *S. pyogenes* en monómeros inactivos por medio de la adición de NaClO₄ o por otras sales, así como por un incremento en el pH. Los espectros de DC de la enolasa octamérica en comparación con los espectros del monómero de la enolasa de *S. pyogenes* mostraron diferencias sutiles pero sin pérdida de la estructura secundaria, estos resultados fueron semejantes a los reportados para la enolasa de *P. falciparum* (Pal-Bhowmick et al. 2007) y levadura (Pal-Bhowmick et al. 2007; Zhao et al. 2008).

Sin embargo, a diferencia de los monómeros activos obtenidos para *P. falciparum*, para *S. pyogenes* los monómeros se reportan como inactivos (Karbassi et al. 2010). En la **Figura 5** se muestran los espectros de DC reportados para la enolasa de *S. pyogenes*.

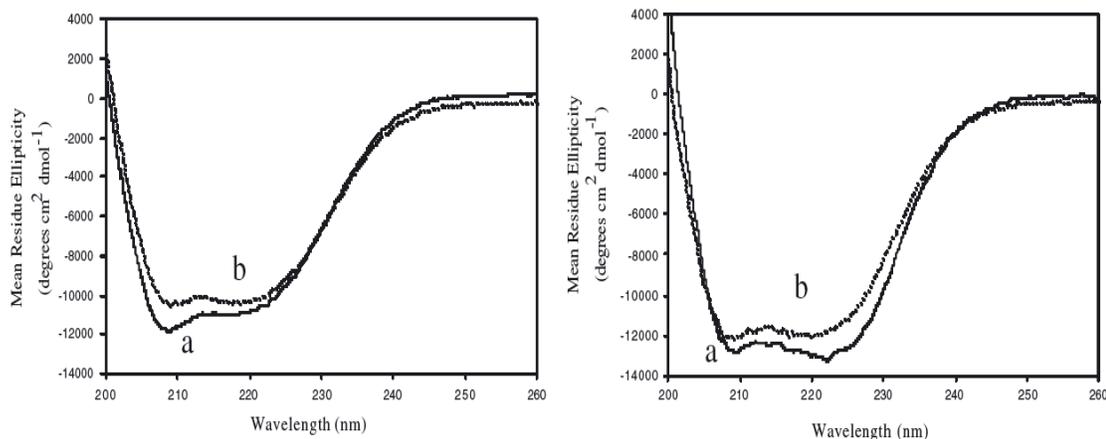


Figura 4. Espectros de dicroísmo circular de enolasa de *P. falciparum* y levadura.

Izquierda. Espectro de dicroísmo circular de *P. falciparum*. **Derecha.** Espectro de dicroísmo circular de levadura. Dimero: a, monomer: b.

(Pal-Bhowmick et al. 2007)

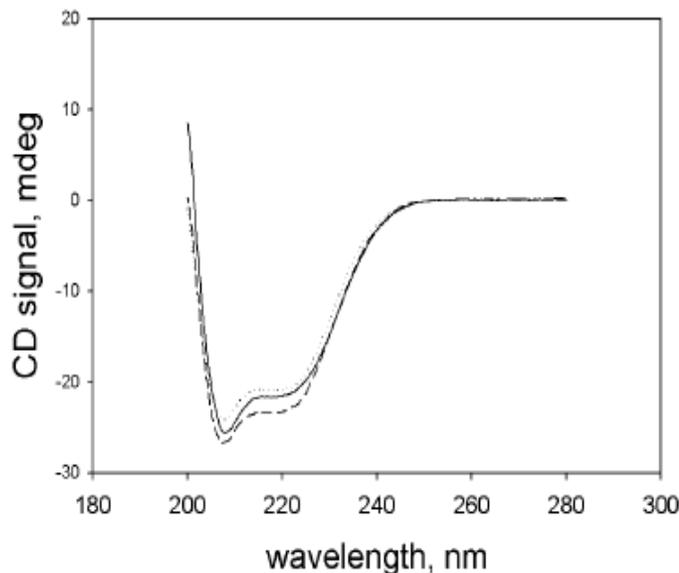


Figura 5. Espectros de dicroísmo circular de enolasa de *S. pyogenes*.

Proteína en tampón TME pH 7.4 (estado octamerico favorecido): línea continua, proteína en tampón TME con 0.2 M NaClO₄: línea punteada, proteína en tampón glicina pH 10 (estado monomerico favorecido): línea discontinua.

(Karbassi et al. 2010)

Continuando con la caracterización de la estructura y de estabilidad de la enolasa de levadura, estudios posteriores describieron las estructuras secundarias y terciarias de esta proteína en tres ambientes químicos diferentes: tampón de tris-HCl, tampón de tris-acetatos y tampón de fosfato de potasio. Los espectros de CD y de emisión de fluorescencia fueron superponibles, lo que indica que la estructura secundaria y los entornos de aminoácidos aromáticos (tirosina y de triptófano) no sufren modificaciones importantes a causa de un cambio en su ambiente químico (tampón). Así mismo también se caracterizó el desplegamiento químico de la enzima en presencia de Urea y cloruro de guanidinio (GndCl) (Sanchez-Miguel et al. 2010).

Pal-Bhowmick y colaboradores también analizaron los espectros de emisión de fluorescencia para los estados monoméricos, diméricos y desnaturalizados de la enolasa de *P. falciparum* y de levadura. Para ambas de estas enzimas, la disociación de enolasa en monómeros condujo a una disminución en la intensidad de emisión. Sin embargo, para la enolasa de *P. falciparum* el centro espectral de masas se desplazó a la izquierda al disociarse, mientras que para enolasa de levadura se observó un ligero desplazamiento hacia la derecha lo que indica un aumento en la accesibilidad de los fluoróforos de triptófano (**Figura 6**) (Pal-Bhowmick et al. 2007).

2.2.3.1 Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de la enolasa ha sido también estudiada, para la enolasa de levadura, Moreno-Vargas y colaboradores describieron el perfil de desplegamiento térmico y experimentos cinéticos, de la enolasa de levadura con o sin su cofactor Mg^{2+} . En la **Figura 7** se muestra el espectro de desnaturalización inducida por temperatura para la enolasa de levadura con y sin su cofactor. En los tres ambientes químicos examinados se observó que el Mg^{2+} incrementa la estabilidad térmica de la enolasa. Además proponen posibles modelos de la reacción de desplegamiento para cada condición experimental (Moreno-Vargas et al. 2011).

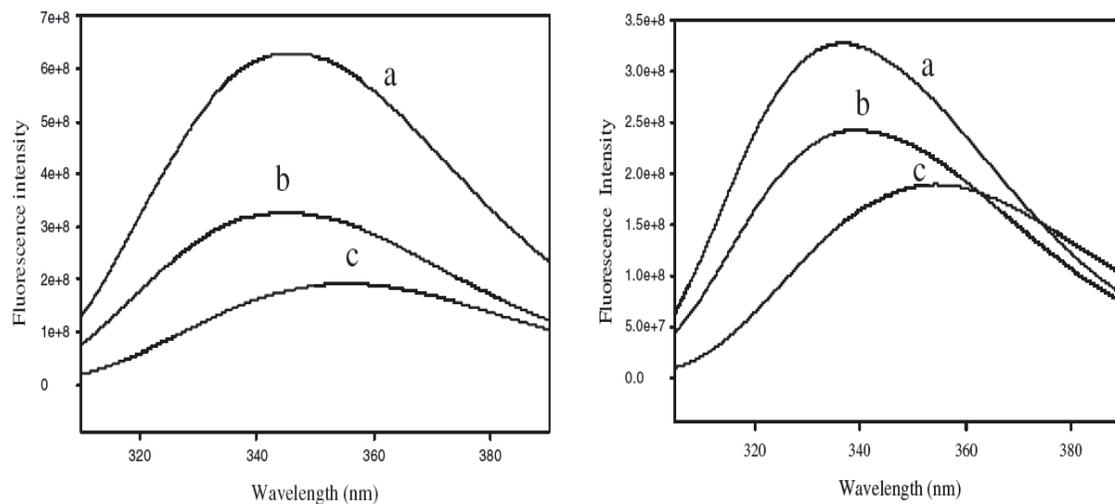


Figura 6. Espectros de emisión de fluorescencia de enolasa de *P. falciparum* y levadura.

Izquierda: enolasa de *P. falciparum*. **Derecha:** enolasa de levadura. Dímero: a, monómero: b, desnaturada en urea: c.

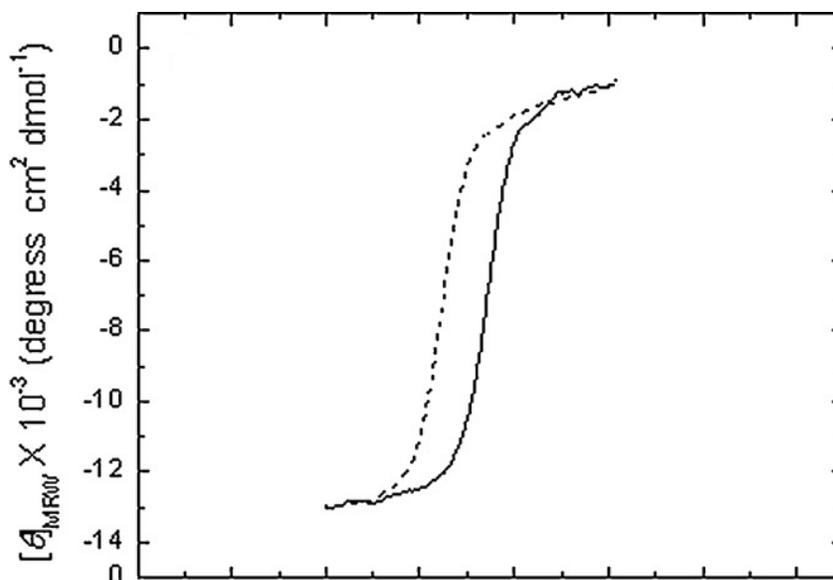


Figura 7. Desnaturalización térmica de la enolasa de levadura.

La reacción de desnaturalización fue controlada en un equipo de dicroísmo circular, en tampón de tris-acetato de tris a pH 7,4. Enolasa sin magnesio (1 mM EDTA): línea discontinua. Enolasa con 2 mM de $MgSO_4$: línea continua.

(Moreno-Vargas et al. 2011)

2.2.3.2 Entalpia de activación (ΔH^\ddagger)

El plegamiento de una proteína es comúnmente caracterizado a partir de la desnaturalización de la misma. Para el cálculo de la entalpia de activación de la enolasa de levadura, se exploró el curso de la reacción de desnaturalización a una temperatura constante (varias temperaturas cercanas a el punto medio de la desnaturalización térmica de la proteína fueron examinadas) mediante los cambios en los espectros de DC a 220 nm. Posteriormente las constantes de velocidad asociadas a la reacción de despliegue fueron calculadas a partir de los datos. Para la enolasa en ausencia de su cofactor se sugiere la presencia de al menos un intermedio cinético en estas condiciones experimentales, cuyos valores de entalpia de activación calculados fueron: 185 kJ mol^{-1} y 25 kJ mol^{-1} , mientras que para la enolasa en presencia de su cofactor la entalpia de activación calculada fue de 190 kJ mol^{-1} (Moreno-Vargas et al. 2011).

2.2.4 Estructura cuaternaria de enolasa

La cristalografía de proteínas ha sido una técnica clave en la determinación de las estructuras cuaternarias de las proteínas, incluida la enolasa de distintas especies. Hasta hace algunos años la mayoría de las estructuras cuaternarias presentadas para la enolasa exhibían una estructura de homodímero (*S. cerevisiae*, *E. coli*, *T. brucei*, langosta y humano) (da Silva Giotto et al. 2003; Duquerroy et al. 1995; Kang et al. 2008; Kuhnel and Luisi 2001; Zhang et al. 1997). Sin embargo, en los últimos años se han divulgado diversas estructuras cuaternarias de enolasa organizadas en octámeros (*Synechococcus elongatus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus suis*, *Sinorhizobium meliloti*, *Bacillus subtilis*, *Anaerostipes caccae*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus pneumoniae*), con ocho subunidades dispuestas como un tetrámero de dímeros (Ehinger et al. 2004; Lu et al. 2012; Newman et al. 2012; Wu et al. 2015). En la **Figura 8** se muestran dos ejemplos de estructuras cuaternarias de dos organismos obtenidas a partir de la técnica de difracción de rayos X.

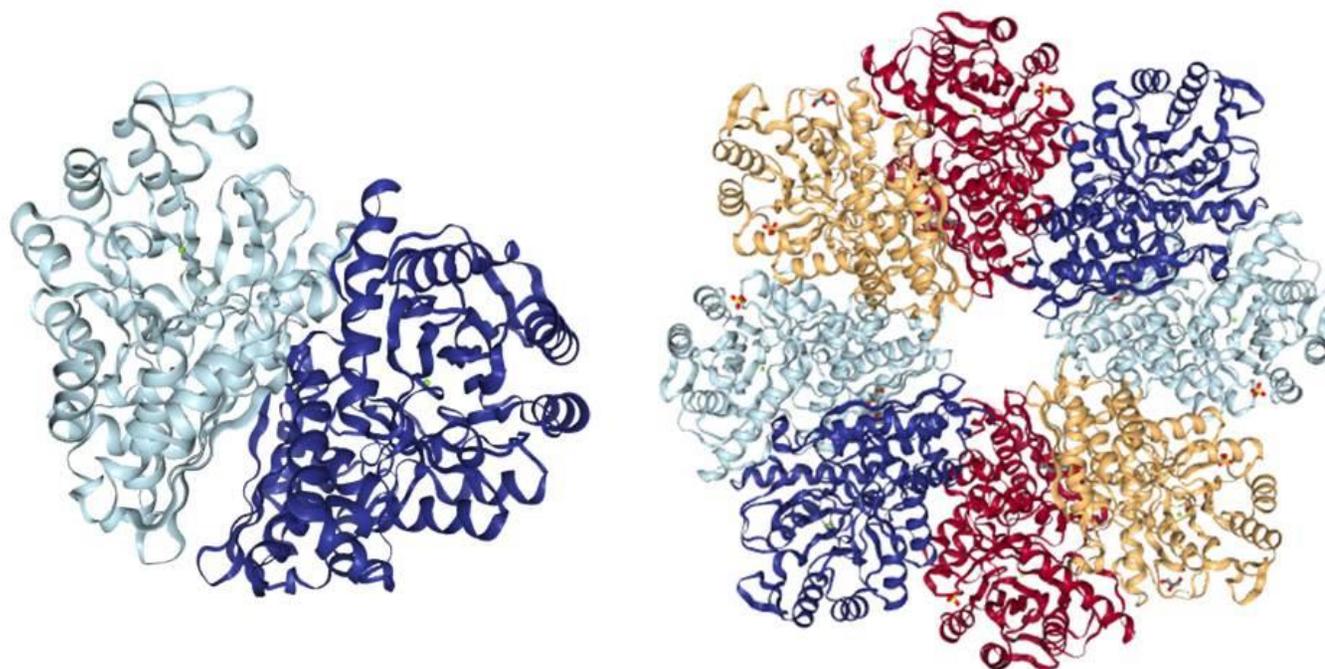


Figura 8. Estructuras cuaternarias de enolasa de *E. coli* y *C. jejuni*.

Izquierda: Estructura enolasa de *E. coli* (1E9D). Derecha: Estructura de enolasa de *C. jejuni* (3QN3). Figuras obtenidas de banco de datos de proteínas. Las estructuras fueron obtenidas a partir de la técnica de difracción de rayos X (Kuhnel and Luisi 2001; Osipiuk et al.).

La estructura cuaternaria para la enolasa de *E. coli* por ejemplo fue obtenida mediante difracción de rayos X a una resolución de 2.5 Å, la estructura cuaternaria de la enzima fue descrita como un homodímero, y fue obtenida en su conformación cerrada (sin inhibidores), esta conformación es equivalente a la conformación del complejo enolasa con sustratos e inhibidores de levadura (Kuhnel and Luisi 2001). En general, podemos decir que las estructuras de la enolasa de *E. coli*, *Enterococcus hirae*, levadura y langosta son muy similares. Las estructuras de las tres proteínas solo difieren ligeramente en la conformación de los bucles. (Kuhnel and Luisi 2001). Aun en las enolasas octáméricas, cada una de las subunidades tienen la misma topología básica e interacciones de subunidades que las enolasas díméricas, esto indica que la estructura de la enolasa se conservaba evolutivamente entre los eucariotas y los procariotas (Hosaka et al. 2003).

2.2.5 Función glucolítica de enolasa

Estudios iniciales de mutagénesis dirigida al sitio indican que la reacción se produce de manera gradual y secuencial, como primer paso un aminoácido básico de la enzima elimina el protón no ácido (H^+) del C-2 del 2-fosfo-D-glicerato (2-PGE), posteriormente ocurre la eliminación del hidróxido (OH^-) del C-3 del 2-fosfo-D-glicerato para llevar así a la formación del producto fosfoenolpiruvato (PEP) (Anderson et al. 1994; Dinovo and Boyer 1971).

Se han reportado parámetros catalíticos como la actividad específica de un gran número de proteínas enolasa de diferentes filos, dichos parámetros pueden ser consultados en la base de datos sobre la compresión de la información enzimática BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/>) (EC4.2.1.11). Entre la información reportada para esta enzima se encuentra la actividad específica de la enolasa recombinante de *Plasmodium falciparum*, la cual se evaluó en 30 Umg^{-1} , dicha actividad fue determinada empleando 2-fosfoglicerato como sustrato, esta enzima fue inhibida en presencia de altas concentraciones de Mg^{2+} (Pal-Bhowmick et al. 2004). Estos valores pueden ser comparados con la actividad específica reportada para la enolasa de *Klebsiella pneumoniae*, cuyo valor oscila entre los 31 Umg^{-1} , esto nos sugiere que estas

enzima tiene propiedades catalíticas similares, y a su vez estos valores son comparables a los de la enolasa de musculo de humano (Pietkiewicz et al. 2009).

Si bien los valores de actividad específica de las proteínas varían en base las condiciones de evaluación de la actividad catalítica, por ejemplo, la actividad máxima presentada por la enolasa recombinante de *Brucella abortus*, fue mostrada en un tampón de MgSO_4 pH 8.5 a 37°C (Han et al. 2012). En cambio la enolasa de levadura expresa su actividad específica máxima (110 U mg^{-1}) en un tampón de tris–acetatos, mientras que en el tampón de tris–HCl su actividad específica decae a 70 U mg^{-1} , en general estos parámetros son comparables (Sanchez-Miguel et al. 2010). En el **Cuadro 3** se muestran más detalles sobre la actividad específica reportada para enolasas de diversas especies.

Con base en la gran similitud de los parámetros catalíticos y la estabilidad de la función catalítica a pesar de la gran distancia entre estas las especies, podemos suponer que las estructuras del sitio catalítico de esta enzimas son altamente conservadas (Pietkiewicz et al. 2009).

A la fecha no existe reporte alguno sobre la actividad enzimática para la enolasa (recombinante o nativa) de bacterias pertenecientes al genero *Helicobacter*. Asi mismo es importante mencionar que previo a este trabajo solo existía un reporte de una enolasa sin actividad enzimática (inactiva), estos estudios la enolasa recombinante se expresó en cuerpos de inclusión y se solubilizó con urea (el extractor más eficiente), Triton X-100 y TCA. La purificación de la enolasa fue parcial y dió como resultado un bajo rendimiento. No se detectó actividad enzimática para las enolasas recombinantes y nativas, lo que indica que *X. fastidiosa* no utiliza la vía glucolítica para metabolizar los carbohidratos (Facincani et al. 2003).

2.2.6 Enolasa: proteína multifuncional

Como anteriormente se mencionó las últimas investigaciones indican que la enolasa es una proteína multifuncional (“moonlighting”), esto debido a que en los últimos años se han descubierto otras funciones que la enolasa lleva a cabo en las células, distintas a su función habitual en la glucólisis.

La enolasa recombinante de rata mostro actividad de unión al ARN (Hernandez-Perez et al. 2011), así mismo recientemente se reportó la unión de la enolasa de *Streptococcus pneumoniae* a ARN extracelular del huésped en la superficie de la bacteria (Zakrzewicz et al. 2016). Mientras que algunos estudios de *Escherichia coli* indican que en la enolasa junto con otras enzimas forma una multienzima, el “degradosoma” relacionado con el procesamiento y decaimiento del ARN (Kaberdin and Lin-Chao 2009).

Cuadro 3. Actividad específica mostrada por enolasa de diferentes especies.

Actividad específica [μmol/min/mg]	Especie	Condiciones	Referencia
35	<i>Candida albicans</i>	pH 6.8, 30°C	(Kustrzeba-Wojcicka and Golczak 2000)
124	<i>Enterococcus hirae</i>	pH 7.5, 22°C	(Hosaka et al. 2003)
85	<i>Trypanosoma brucei</i>	pH 7.6, 25°C	(Hannaert et al. 2003)
111	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Temperatura ambiente, pH 7.5, MgCl ₂ , KCl, ácido 2-fosfoglicérico	(Ehinger et al. 2004)
30	<i>Plasmodium falciparum</i>	pH 7.4, 20 °C, Tris-HCl	(Pal-Bhowmick et al. 2004)
48	<i>Curvularia lunata</i>	Purificada a partir de cuerpos de inclusión	(Sharma et al. 2006)
75	Homo sapiens	Después de ser purificada 83 veces, a pH 6.8	(Bednarz-Misa et al. 2009)
31.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Purificada 76 veces a pH 7.8, con una tasa de recuperación del 14%.	(Bednarz-Misa et al. 2009)
35.81	<i>Schistosoma japonicum</i>	Enzima recombinante purificada, pH 7.4, 20 °C	(Yang et al. 2010)
110 70	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tampon de tris-acetato o tris-HCl. Tampón de fosfato.	(Sanchez-Miguel et al. 2010)
9091	<i>Brucella abortus</i>	Enzima recombinante, pH 8.5, 37 °C, 10 mM Mg ²⁺	(Han et al. 2012)

Tabla elaborada con antecedentes de la base de datos BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/>)

La enolasa de algunos organismos eucariotas está involucrada en la regulación de la morfología celular a través de la regulación de la dinámica del citoesqueleto mediante su unión a los microtúbulos (Keller et al. 2007). Algunos reportes recientes indican que la ENO1 tiene una actividad no catalítica en la metástasis de cáncer, en enfermedades autoinmunes y en enfermedades infecciosas (Kang et al. 2008; Pancholi 2001). Referente a esta última función se sabe también que la enolasa en la superficie participan en la invasión de bacterias patógenas en los tejidos, lo que ayuda a establecer la infección (Bergmann et al. 2003; Kang et al. 2008).

La enolasa se ha encontrado en la superficie de varias células eucariotas y procariotas en las que actúa como proteína de unión al plasminógeno. Se ha informado que un gran número de especies patógenas (bacterias y protozoarios) intervienen con el sistema de plasminógeno, es decir la unión de la enolasa con plasminogeno. Algunos de los organismos para los que se han reportado esta actividad no catalítica para la enolasa son: *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania mexicana*, *Leptospira* y *Pseudomonas aeruginosa*. Esta función no catalítica de la enolasa tiene grandes implicaciones ya que puede contribuir a aumentar el potencial invasivo de los agentes patógenos, así mismo también se ha sugerido podría contribuir al potencial de virulencia de los organismos patógenos (Agarwal et al. 2008; Bergmann et al. 2001; Ceremuga et al. 2014; Chauhan et al. 2012; Jones and Holt 2007; Mundodi et al. 2008; Salazar et al. 2017; Vanegas et al. 2007).

En el caso de la α -enolasa de *Bacillus anthracis* además de su interacción con plasminogeno la enolasa también ha sido clasificada como un antígeno inmunodominante y como un potente factor de virulencia (Agarwal et al. 2008).

Otra actividad no catalítica de gran relevancia es la recientemente elucidada para la enolasa de *Brucella abortus*, esta enzima mostró capacidad de unión a la fibronectina, esto sugiere que la enolasa puede desempeñar un papel importante en la colonización, persistencia e invasión del tejido huésped (Han et al. 2012).

Como anteriormente se mencionó la enolasa de *Trichomonas vaginalis* actúa como receptor de plasminógeno en la superficie celular, e interesantemente la expresión de la enzima se incrementa al contacto con las células del epitelio vaginal, estos hallazgos han

servido para clasificar a la enolasa como un blanco molecular idóneo, ya que dos procesos esenciales en la biología de *T. vaginalis* parecen ser realizados por una misma enzima y un mismo fármaco podría inhibir ambos procesos (Mundodi et al. 2008).

Todo parece indicar que en muchas patologías la enolasa pueda ejercer una de sus múltiples funciones, principalmente como: receptor de plasminógeno, promoviendo invasión de tejidos, activando las vías de supervivencia intracelular, controlando apoptosis de las células, facilitando la diseminación del patógeno y a la virulencia del patógeno, entre otras (Ceremuga et al. 2014; Cork et al. 2009; Diaz-Ramos et al. 2012; Kim et al. 2007; Salazar et al. 2017; Whiting et al. 2002). Debido a estos recientes hallazgos y al gran número de especies bacterianas patógenas que intervienen con el sistema de plasminógeno surgió la conjetura de que las bacterias utilizan este sistema para la migración a través de barreras de tejido o bien para satisfacer sus demandas nutricionales durante la infección. (Chauhan et al. 2012). En el **Cuadro 4** se resumen algunas de las funciones no glucolíticas reportadas en diversos organismos para enolasa.

A pesar de que se han realizado diversos estudios de la enolasa de distintas especies biológicas, pertenecientes a varios ordenes filogenéticos, la enolasa *H. pylori*, prácticamente no ha sido caracterizada; por lo que, en este trabajo de tesis, se llevo a cabo su clonación, secuenciación, purificación, así mismo se analizó la secuencia, estructura, estabilidad y catálisis enzimática de la hpENO.

Cuadro 4. Funciones no glucolíticas reportadas para la enolasa.

Organismo	Función	Referencia
Células eucariotas	Morfología celular y tráfico de material	(Keller et al. 2007)
Mamíferos	Regulación transcripcional de genes	(Lung et al. 2010)
<i>Plasmodium spp</i>	Proceso de invasión de tejido	(Bhowmick et al. 2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Componente de la superficie celular	(Lopez-Villar et al. 2006)
<i>Escherichia coli</i>	Componente del degradosoma	(Kaberdin and Lin-Chao 2009)
<i>Homo sapiens</i> <i>Bacillus anthracis</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Streptococcus mutans</i> <i>Trichomonas vaginalis</i> <i>Leishmania mexicana</i>, <i>Leptospira</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	Unión a plasminogeno	(Kang et al. 2008) (Agarwal et al. 2008) (Bergmann et al. 2001) (Ceremuga et al. 2014) (Chauhan et al. 2012) (Jones and Holt 2007) (Mundodi et al. 2008) (Salazar et al. 2017) (Vanegas et al. 2007) (Candela et al. 2009)
<i>Homo sapiens</i> <i>Streptococcus Pneumoniae</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Brucella abortus</i> <i>Trichomonas vaginalis</i>	Participación en el establecimiento de la infección	(Kang et al. 2008) (Bergmann et al. 2003) (Agarwal et al. 2008) (Han et al. 2012) (Mundodi et al. 2008)
<i>Rattus norvegicus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Unión a ARN	(Hernandez-Perez et al. 2011) (Zakrzewicz et al. 2016)

3. JUSTIFICACIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* afecta a más de la mitad de la población mundial y es un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer gástrico. Este padecimiento se trata mediante un esquema combinado de antibióticos e inhibidores de la bomba de protones. Sin embargo, el porcentaje de cepas resistentes a los diversos antibióticos empleados ha incrementado en los últimos años.

La enolasa es una enzima que lleva a cabo la deshidratación de 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato en la vía de la glucólisis, esta función la convierte en una enzima clave para el metabolismo de la glucosa. Además, en los últimos años esta proteína ha sido causa de gran interés debido a su asociación con otras funciones importantes en varios organismos, principalmente estas funciones se asocian a la conservación de la estructura, infección y mecanismos de virulencia de organismos patógenos. Lo que hace necesario su caracterización bioquímica y estructural. En este trabajo se realiza la obtención de la enolasa recombinante de *H. pylori*, para su posterior caracterización bioquímica y estructural. Estos aspectos contribuirán a la información y caracterización básica de la enzima. Además, permitirán enriquecer el conocimiento sobre el metabolismo de *H. pylori*.

4. HIPÓTESIS

La clonación, expresión y purificación de la enzima recombinante enolasa de *Helicobacter pylori* permitirá caracterizar su estructura y estabilidad, vislumbrar su proceso de plegamiento e inferir sobre el funcionamiento de la proteína en la bacteria. Toda esta información será útil para contribuir al conocimiento del metabolismo, mantenimiento y proceso de infección que conducen a la enfermedad a causa de esta bacteria.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener y caracterizar bioquímica y estructuralmente a la enolasa recombinante de *Helicobacter pylori*.

5.2 Objetivos específicos

1. Analizar las secuencias de enolasas de diferentes especies biológicas.
2. Obtener la enolasa recombinante de *Helicobacter pylori* en su forma más pura posible.
3. Caracterizar la estructura de la enzima enolasa de *Helicobacter pylori*.
4. Caracterizar bioquímicamente a la enolasa de *Helicobacter pylori*.
5. Proponer sitios blancos para la enzima enolasa de *Helicobacter pylori*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Material genético

ADN genómico de la bacteria *H. pylori* cepa 26695 fue empleado como molde para la amplificación del gen de la enolasa de *H. pylori* (*hpeno*).

El material genético de *H. pylori* cepa 26695 fue amablemente donado por el Dr. German Rubén Aguilar Gutiérrez del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública, ubicado en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, México.

6.1.2 Células competentes

Cepas de *Escherichia coli* fueron pre-tratadas con iones Ca^{2+} para producir un aumento de la permeabilidad de la membrana.

6.1.2.1 *Escherichia coli* DH5 α TM

La cepa *Escherichia coli* DH5 α TM de la casa comercial Invitrogen está diseñadas para la clonación y subclonación en general. Las células de *E. coli* DH5 α TM se emplearon en la clonación y subclonación de *hpeno* en los vectores pGEM[®]-T Easy y pET-19b modificado (pET-19b_modificado) respectivamente, así como para la conservación del inserto *hpeno*.

6.1.2.2 *Escherichia coli* BL21 (DE3)

La bacteria *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) de la casa comercial de la casa comercial Stratagene, permite una expresión proteica de fácil inducción y de alto nivel. Células calcio-competentes de *E. coli* BL21 (DE3) fueron empleadas en la expresión de la enzima enolasa de *H. pylori*.

6.1.2.3 *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS

Las células BL21 (DE3) pLysS proporcionan un control más estricto de la expresión de proteínas para la expresión de proteínas tóxicas y poseen un plásmido con resistencia al cloranfenicol. Células calcio-competentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS fueron empleadas en la expresión de la enzima enolasa de *H. pylori*.

6.1.2.4 *Escherichia coli* Rosetta-gamiTM

La bacteria *Escherichia coli* Rosetta-gamiTM de la casa comercial Novagen, es una cepa derivada de OrigamiTM que combinan la formación mejorada de enlaces disulfuro con una expresión mejorada de proteínas que contiene codones raramente utilizados en *E. coli*. Esta cepa suministra ARNt para los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y GGA.

Células calcio-competentes de *E. coli* Rosetta-gamiTM fueron empleadas en la expresión de la enzima enolasa de *H. pylori*.

6.1.3 Vectores

6.1.3.1 pGEM[®]-T Easy

El vector comercial pGEM[®]-T Easy de la casa comercial Promega es un vector linealizado con una única timidina -3' terminal en ambos extremos del sitio de inserción, las cuales mejoran la eficiencia de ligación de productos de PCR y evitan la recircularización del vector. Este vector también contiene el sistema de identificación de recombinantes mediante cribado azul/blanco en placas con Ampicilina, Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside (X-Gal). El buffer del vector pGEM[®]-T Easy permite extender el período de incubación de las reacciones de ligación para aumentar el número de colonias después de la transformación. En general, una incubación durante la noche a 4 °C produce la cantidad máxima de transformantes.

El vector comercial pGEM[®]-T Easy fue utilizado para la clonación del producto de PCR del gen *hpeno*, este vector nos ayudó a incrementar la eficiencia de ligación y clonación del inserto (gen *hpeno*), así mismo nos permitió generar un

resguardo del gen en dicho vector. En la **Figura 9** se muestra un esquema general de la estructura del vector pGEM[®]-T Easy.

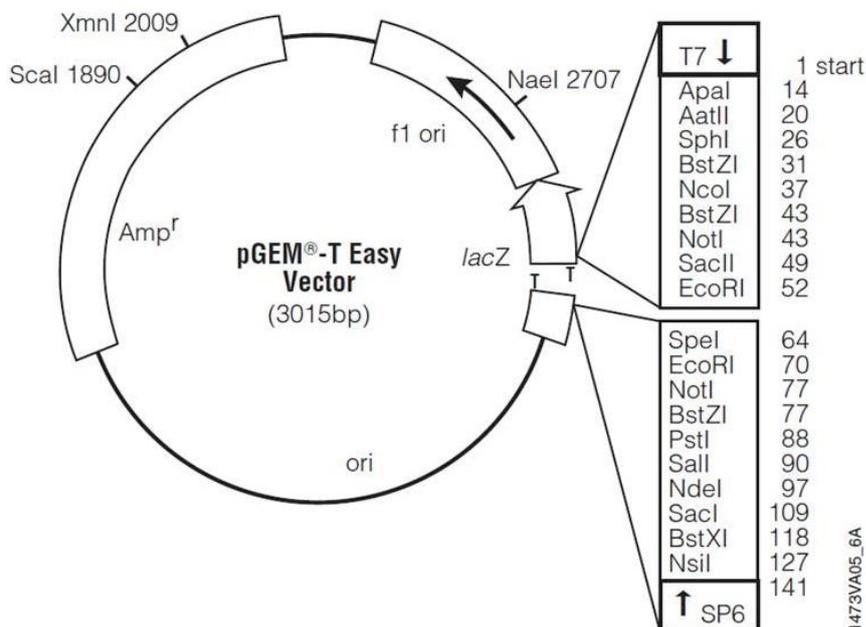


Figura 9. Representación esquemática del vector de pGEM[®]-T Easy.

Tomado de Promega[®]

6.1.3.2 pET-19b modificado

El vector pET-19b modificado (EMD Biosciences, San Diego, CA, EE. UU.), es una modificación del vector comercial pET-19b de la casa comercial Novagen (**Figura 10**). La innovación incorporada al vector consistió en la adición del sitio de corte de la enzima PreScission Protease (PSP). El vector pET-19b modificado fue donado por el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), unidad Irapuato.

El vector pET-19b modificado fue empleado para la sub-clonación del gen *hpeno* en y para la expresión de la proteína hpENO.

6.1.3.3 Construcción vector::psp

La construcción del vector::*psp* fue donada por el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), unidad Irapuato. Este vector se empleó para la

expresión de la enzima PreScission Protease (PSP), esta enzima fue utilizada en la eliminación del tracto de histidinas de hpENO.

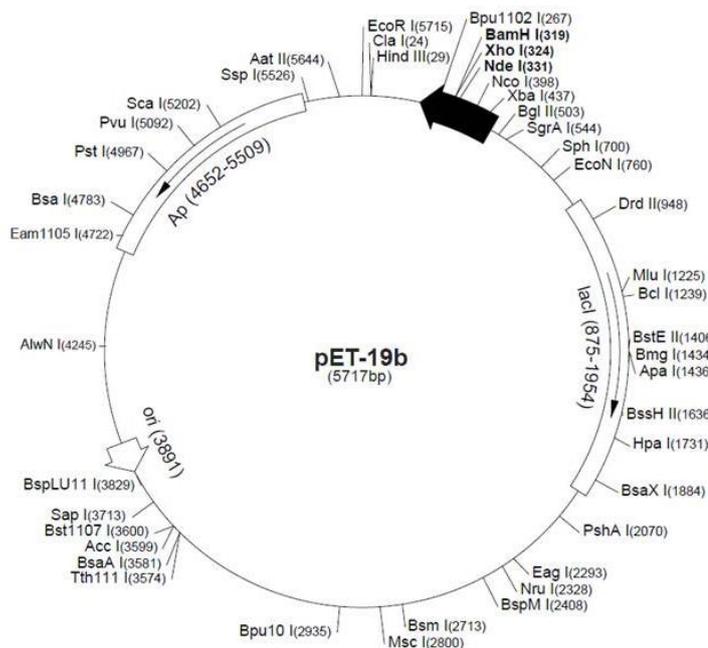


Figura 10. Esquema general de plásmido pET-19b.

6.2 Métodos

6.2.1 Preparación de células calcio-competentes

Un matraz con 50 ml de medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB) fue inoculado con 500 μ l - 2,000 μ l de pre-cultivo de células de *E. coli* DH5 α TM o Rosetta-gami (según lo requerido) con 8-12 h de crecimiento. Posteriormente el matraz se colocó en una incubadora Thermo Scientific (Modelo 435), a una temperatura constante de 37 °C y con agitación de 200 rpm. Con la ayuda de un espectrofotómetro Beckman coulter se evaluó la densidad óptica del cultivo a 600 nm hasta que alcanzo una OD₆₀₀ de 0.5. Una vez que el cultivo alcanzó la OD₆₀₀ requerida el matraz se colocó en un recipiente con hielo en agitación suave durante 30 min, posteriormente el cultivo se cambió a tubos tipo falcón de 50 ml y se centrifugó 20 min a 4,000 rpm a una temperatura de 4 °C. Cuidadosamente se decantó el sobrenadante y el sedimento de células se re-suspendió suavemente en 10

ml de CaCl₂ 0.1 M estéril. Las células en re-suspensión se colocaron nuevamente en un recipiente con hielo por 30 min en agitación suave, posteriormente se centrifugó durante 20 min a 4000 rpm a una temperatura constante de 4 °C. El sobrenadante obtenido se desechó y el sedimento de células se re-suspendió en 1,700 µl de CaCl₂ 0.1 M y 300 µl de glicerol al 100 %. Finalmente se formaron alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

6.2.2 Amplificación del gen de la enolasa de *H. pylori*

La amplificación de gen de la enolasa de *H. pylori* (*hpeno*) se llevó a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos (sentido y contrasentido) utilizados para la amplificación del gen *hpeno* fueron diseñados en base a la secuencia de la enzima enolasa de *Helicobacter pylori* 26695 reportada en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Es importante mencionar que en la región 5' del oligonucleótido sentido se añadió la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción NdeI (CATATG), así mismo en el oligonucleótido contrasentido se agregó la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI (CTCGAG). En el **Cuadro 5** se muestra la secuencia completa de los oligonucleótidos diseñados.

Cuadro 5. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *hpeno*.

Oligonucleótido	Nombre	Secuencia
Sentido	HenoF	GGCCATATGATGCTAACCATTAAGATATTC
Contrasentido	HenoR	AATACTCGAGCTAGCCATGCTTAAACAACCTC

Las concentraciones de los reactivos y las condiciones de la reacción empleadas en la amplificación *hpeno* fueron previamente estandarizadas. El

Cuadro 6 presenta las concentraciones de los reactivos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa. En el

Cuadro 7 se exhiben las condiciones de amplificación de *hpeno* estandarizadas. La PCR se llevó a cabo en un termociclador de la casa comercial Bio-Rad[®], modelo DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler.

Cuadro 6. Concentración de reactivos empleados en la amplificación de *hpeno*.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen (μ l)
Buffer	10.0 X	1.0 X	2.5
MgCl ₂	50.0 mM	1.2 mM	0.6
dNTP's	10.0 mM	0.2 mM	0.4
EnoF	5.0 μ M	0.2 μ M	1.0
EnoR	5.0 μ M	0.2 μ M	1.0
H ₂ O mQ	----	---	18.1
Taq polimerasa	5.0 U/ μ l	0.1 U/ μ L	0.4
DNA genómico <i>H. pylori</i>	250.0 ng/ μ l	10.0 ng/ μ l	1.0

Cuadro 7. Condiciones de amplificación de *hpeno*.

# de ciclos	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (s)
1	94	180
	94	40
30	60	40
	72	90
1	72	420
1	6	∞

Para verificar la correcta amplificación del gen enolasa una vez terminada la reacción de PCR, se preparó un gel de agarosa al 0.7 % en TAE 1X y se montó en una cámara de electroforesis Wide Mini-Sub Cell GT marca Bio-Rad[®] empleando TAE 1X como amortiguador de electroforesis. Se mezcló 1 μ l de producto de PCR (*hpeno*) con 1 μ l de buffer de carga con SYBR Gold y se depositó en el gel. El gel se corrió a un voltaje constante de 90 V durante 50 min. Una vez finalizada la separación electroforética de la secuencia amplificada, el gel se visualizó en un transiluminador ultravioleta y los resultados fueron capturados fotográficamente con un fotodocumentador Kodak Digital Science 1D.

6.2.3 Construcción de vector de clonación (pGEM[®]-T Easy::hpeno)

6.2.3.1 Ligación

El producto de PCR *hpeno* fue ligado con el vector pGEM[®]-T Easy. Las concentraciones requeridas para la mezcla de la reacción de ligación se determinaron en base al protocolo propuesto en el manual del vector pGEM[®]-T Easy. En el **Cuadro 8**, se indican las concentraciones empleadas en la reacción de ligación. A continuación, se describe brevemente el protocolo propuesto en el manual del vector pGEM[®]-T Easy para llevar a cabo la ligación del producto de PCR. Se realizó la mezcla de la reacción de ligación (**Cuadro 8**), posteriormente se incubó la mezcla de la reacción de ligación a 4 °C, con el fin de incrementar la eficiencia de ligación, la reacción de ligación se incubó durante toda la noche.

Para verificar la construcción pGEM[®]-T Easy::hpeno (vector clonación::inserto) se llevó a cabo una electroforesis vertical. Una cámara de electroforesis Wide Mini-Sub Cell GT de la casa comercial Bio-Rad[®] se llenó con TAE 1X y en ella se montó un gel de agarosa 0.7 %. El primer pozo del gel se cargó con un 1 µl de marcador de peso molecular y 1 µl de buffer de carga; en el segundo pozo se cargaron 2 µl de la reacción de ligación mezclado y 1 µl de buffer de carga con SYBR Gold. La electroforesis se corrió durante 30 min a un voltaje constante de 90 V. Una vez finalizada la separación electroforética, se visualizó el gel en un transiluminador UV y los resultados fueron capturados fotográficamente.

Cuadro 8. Concentración de reactivos de reacción de ligación pGEM[®]-T Easy::hpeno.

Reactivo	Concentración	Concentración final	1X(µl)
Buffer de ligación rápida	2.0 X	1.0 X	8.0
pGEM [®] -T Easy	50 ng	3.13 ng	1.0
Ligasa T4 DNA	3 U/µl	0.19 U	1.0
Producto de PCR (<i>hpeno</i>)	36 ng/µl	6.0 ng	6.0

6.2.3.2 Transformación de células *E. coli* DH5α[™]

La transformación de las células calcio-competentes de *E. coli* DH5α[™], se realizó siguiendo el protocolo propuesto en el manual del vector pGEM[®]-T easy, el

cual se describe brevemente a continuación. La reacción de ligación se centrifugó ligeramente y se mezcló con ayuda de la pipeta, consecutivamente se tomaron 5 μ l de la reacción de ligación y se añadieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml colocado en hielo. Posteriormente se adicionaron 100 μ l de células calcio-competentes de *E. coli* DH5 α TM (previamente descongeladas en hielo), la mezcla de la reacción de ligación y células se incubó por 20 min en hielo, posteriormente se dio un choque térmico al tubo de reacción colocándolo a 42 °C por 50 s, y posteriormente se incubó nuevamente en hielo por 2 min. Se adicionó al tubo 500 μ l de medio líquido LB y se incubó a 37 °C a 200 rpm durante 90 min. Terminado el tiempo de incubación, se homogenizó el cultivo con ayuda de la pipeta, se tomaron 100 μ l, y se inocularon en cajas de agar LB con 100 μ g/ml de Ampicilina, 100 μ l de IPTG [100 mM] y 20 μ l de X-Gal [50 mg/ml] previamente preparadas. Las cajas inoculadas se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

6.2.3.3 Confirmación de colonias

Las colonias blancas crecidas fueron seleccionadas y la presencia del inserto *hpeno* en las colonias fue confirmada por PCR en colonia. El protocolo empleado se describe a continuación: Se seleccionaron las colonias y fueron re-sembradas en cajas de LB y ampicilina [100 mg/ml] por duplicado, se crecieron a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se picaron las colonias con un palillo de madera estéril y se re-suspendieron en 5 μ l de H₂O estéril, posteriormente se dio una breve centrifugación a los tubos y se llevaron al termociclador para la lisis de las células. El programa empleado para la lisis se muestra en el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Condiciones de lisis de células para PCR en colonia.

# de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	96	300
1	50	90
1	96	90
1	45	90
1	96	60
1	40	60

Posteriormente se realizó la mezcla para la reacción de PCR en colonia. Los reactivos y concentraciones optimizadas se muestran en el **Cuadro 10**.

Cuadro 10. Concentración de reactivos para PCR en colonia.

Reactivo	Concentración	Concentración final	Volumen (μ l)
Buffer	10.00X	1.00 X	2.50
MgCl ₂	50.00 mM	1.50 mM	0.75
dNTP's	10.00 mM	0.20 mM	0.50
Eno F	5.00 μ M	0.20 μ M	1.00
Eno R	5.00 μ M	0.20 μ M	1.00
H ₂ O mQ	---	---	16.75
Taq	5.00 U/ μ l	0.1 U/ μ l	0.50
Colonia lisada	--		2.00

La mezcla de reacción, se homogenizó en vortex, posteriormente se dio una breve centrifugación al tubo y las muestras se colocaron en un termociclador marca Bio-Rad[®], modelo DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler. Las condiciones para la reacción de PCR en colonia se muestran en el **Cuadro 11**.

Cuadro 11. Condiciones de amplificación de PCR en colonia.

# de ciclos	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (s)
1	94	180
	94	40
35	60	40
	72	90
1	72	420
1	6	∞

6.2.3.4 Extracción de ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico de las células transformadas de *E. coli* DH5 α TM con el vector de clonación (pGEM[®]-T Easy::hpeno) se llevó a cabo con el estuche comercial QIAprep Spin Miniprep de la casa comercial QIAGEN. Se siguió

el protocolo propuesto por QIAGEN, dicho protocolo se describe a continuación: Se seleccionó una de las colonias positivas en la PCR en colonia, y se inoculó en medio líquido LB con ampicilina [100 µg/ml], se incubó a 37 °C a 150 rpm durante toda la noche. Se agregaron 1.5 ml de cultivo a 5 tubos eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante, se adicionó nuevamente 1.5 ml de cultivo a cada uno de los tubos, se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. El sobrenadante fue desechado y el sedimento celular se re-suspendió en 250 µl del Buffer P1, a continuación, se añadieron 250 µl de Buffer P2 y se mezcló por inversión 5 veces, posteriormente se añadió 350 µl del Buffer N3 y se mezcló por inversión 5 veces. Las mezclas contenidas en los tubos fueron centrifugadas por 10 min a 13,000 rpm, el sobrenadante se agregó a una mini-columna y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm (Nota: se empleó una sola mini-columna para centrifugar el sobrenadante procedente de los 5 tubos). Posteriormente la mini-columna se lavó con 500 µl de Buffer PB y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm, a continuación, el eluido se descartó y se adicionó a la mini-columna 750 µl de Buffer PE, la mini-columna se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm, el eluido se descartó y se centrifugó nuevamente la mini-columna por 2 min a 13,000 rpm para eliminar residuos. Finalmente, la mini-columna fue transferida a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se añadieron 50 µl de H₂O₂, se incubó por 5 min a T_{amb} y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min. El eluido se añadió nuevamente a la columna se incubó por 1 min y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min, esto último se repitió 4 veces más para aumentar la eficiencia de eluido del ADN plasmídico. El ADN plasmídico se almacena a -20 °C hasta su uso.

6.2.3.5 Verificación de inserto

Para la verificación del inserto *hpeno* en el vector pGEM[®]-T Easy se realizaron dos procedimientos: digestión enzimática del plásmido pGEM[®]-T Easy::*hpeno* y secuenciación del inserto *hpeno*.

La digestión del plásmido pGEM[®]-T Easy::*hpeno* se llevó a cabo con la enzima de restricción EcoRI de la casa comercial Promega. El plásmido pGEM[®]-T Easy posee dos sitios de corte para EcoRI en su región de clonación múltiple. La mezcla de reacción de digestión se realizó siguiendo el protocolo y las

concentraciones sugeridas por la casa comercial de la enzima. A continuación, se describe brevemente el protocolo empleado. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se añadieron uno a uno los reactivos mostrados en el **Cuadro 12**, posteriormente la mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 4 h. Transcurrido el tiempo de digestión, la reacción se detuvo añadiendo 2 µl de mM ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) [0.5 M]. La visualización del resultado de la reacción de digestión se llevó a cabo en electroforesis horizontal. Se mezclaron 2 µl de la reacción de digestión y 1 µl de SYBR Gold, posteriormente se cargó la mezcla en un gel de agarosa 0.7 % y se corrió durante 1 h a 90 V.

Cuadro 12. Mezcla de reacción de digestión de pGEM®-T easy::hpeno.

Reactivo	Concentración	Concentración final	Volumen (µl)
Buffer D	10.00X	1.00X	1.00
H ₂ O mQ	---	---	6.00
EcoRI	12U/µl	0.6U	1.00
pGEM®-T easy::hpeno		1.5µg	2.00

Para la secuenciación del inserto hpeno se empleó un secuenciador de capilar ABI Prism (AppliedBiosistem Modelo 3130) para secuenciación en columnas. Los iniciadores empleados en la reacción de secuenciación estaban diseñados sobre la región del promotor del vector pGEM®-T Easy; T7 Promoter Primer (T7F) y pUC/M13 Reverse Primer (M13R), Se realizaron dos reacciones de secuenciación; la reacción sentido (5' a 3') con el iniciador T7F y la reacción contrasentido (3'a5') con el iniciador M13R (

Cuadro 13).

Cuadro 13. Oligonucleótidos de región promotora de pGEM®-T Easy.

Nombre	Secuencia
T7F	TAATACGACTCACTATAGGG
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC

Los reactivos y concentraciones utilizados en las reacciones de secuenciación se muestran en el **Cuadro 14**. Las condiciones de amplificación para la reacción de secuenciación se muestran en el **Cuadro 15**.

Cuadro 14. Reacción de secuenciación de inserto en pGEM[®]-T Easy.

Reactivo	Concentración	Concentración final	Volumen(μ l)
Buffer bigdye v3.1	5.0 X	1.0 X	4.0 μ l
H ₂ O (mQ)	---	---	6.5 μ l
Iniciador T7F ó M13R	5.0 μ M	1.0 μ M	4.0 μ l
BigDye v3.1 ready mix	2.5 X	1.0 X	4.0 μ l
pGEM [®] -T Easy::hpeno	400.0 ng	30.0 ng	1.5 μ l

Cuadro 15. Condiciones de amplificación para reacción de secuenciación.

# de ciclos	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (s)
1	96	60
	96	10
25	55	5
	62	240
1	62	60
1	6	300

Una vez finalizada la amplificación el producto de PCR, la reacción de secuenciación se purificó con el estuche comercial BigDye[®] X Terminator[™] Purification de la compañía Applied Biosystems. Se siguió el protocolo propuesto por el proveedor, el cual se describe a continuación, se tomaron 10 μ l del producto de PCR y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 10 μ l de X Terminator atemperado a 37 $^{\circ}$ C, posteriormente se añadieron 45 μ l de SAM, se homogenizó por vortex y se incubó por 30 min a 25 $^{\circ}$ C a 11,000 rpm. Posteriormente se centrifugó por 2 min a 13,000 rpm, se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a un tubo eppendorf de 0.2 ml, se dio un spin a 13,000rpm y se llevó a secuenciar. Las secuencias del inserto obtenidas fueron analizadas utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI.

6.2.4 Sub-clonación, construcción de vector de expresión (pET-19b_modif::hpeno)

6.2.4.1 Purificación y preparación de plásmidos

La construcción vector::inserto, pET-19b_modificado::hslep fue donado por el Laboratorio de Bioquímica de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional. El vector de clonación pGEM[®]-T Easy::hpeno, fue obtenido como se describió previamente.

Ambos construcciones de vectores (pET-19b_modificado::hslep y pGEM[®]-T Easy::hpeno) fueron clonadas y posteriormente purificadas con el estuche comercial QIAprep Spin Miniprep de la casa comercial QIAGEN. Se siguió el protocolo de purificación propuesto por el estuche, dicho protocolo fue descrito con detalle anteriormente.

6.2.4.2 Digestión de vectores

Los vectores purificados pGEM[®]-T Easy::hpeno y pET-19b_modificado::hslep fueron digeridos con las enzimas de restricción NdeI y XhoI. Los reactivos y volúmenes empleados para las reacciones de digestión se muestran en el **Cuadro 16**. La reacción de digestión fue realizada en tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron todos los reactivos con excepción de la enzima NdeI, posteriormente la reacción de ligación se incubó durante 3 h a 37 °C, posteriormente se añadió la enzima NdeI y se incubó durante 2 h más a 37 °C. La reacción de ligación se detuvo añadiendo a la mezcla de reacción 5 µl de EDTA 0.5 M y finalmente la reacción se incubó por 10 min a 75 °C.

Cuadro 16. Volumen de reactivos de reacciones de digestión de las construcciones de vectores.

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer D	12.0
NdeI	5.0
XhoI	5.0
H ₂ O mQ	73.0
pET-19b modificado::hslep ó pGEM [®] -T Easy::hpeno	25.0

6.2.4.3 Purificación de vector pET-19b_modificado e inserto *hpeno* digeridos

El producto de la reacción de digestión fue corrido en un gel de agarosa 0.7 %, por 60 min a 90 V. Una vez finalizada la separación electroforética, el gel se visualizó en un transiluminador ultravioleta y con la ayuda de este, se cortaron las bandas correspondientes al vector digerido pET-19b modificado y al inserto digerido *hpeno*. Las bandas seccionadas se cuantificaron y se colocaron por separado en tubos eppendorf de 1.5 ml. La purificación de las bandas se llevó a cabo con el estuche comercial QIAquick Gel Extraction de QIAGEN. A continuación, se describe el protocolo propuesto por el proveedor. Se adicionaron 3 volúmenes del Buffer QG por cada volumen de gel, posteriormente se mezcló por vortex y se incubó a 50 °C por 10 min, en este lapso de tiempo se mezclaron intermitentemente los tubos en vortex. Concluido el tiempo de incubación se adicionó 1 volumen de isopropanol 100 % y se mezcló en vortex. Consecutivamente se transfirió la muestra a una mini columna QIAquick insertada en el tubo de colecta, la columna se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm, el filtrado se descartó. Posteriormente se agregaron 500 µl de Buffer QG a la mini columna y se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm, el filtrado se descartó y a continuación se lavó la mini columna con 750 µl de Buffer PE, se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm, el filtrado se desechó nuevamente. Para eliminar completamente los residuos de las soluciones la mini columna se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 1 min. Subsiguientemente se transfirió la mini columna a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml, se añadieron 20 µl de H₂O libre de nucleasas y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó la columna a 13,000 rpm durante 1 min. Para obtener la máxima concentración posible del vector pET-19b modificado y del inserto *hpeno* digeridos se pasó 4 veces más el eluido por la columna, finalmente se desechó la columna y el ADN eluido se recolectó en el tubo eppendorf. Se corrió un gel de agarosa al 0.7 % para cuantificar la concentración del vector y del inserto. El ADN plasmídico y el inserto purificado fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

6.2.4.4 Ligación vector pET-19b modificado e inserto *hpeno*

El inserto *hpeno* y el vector pET-19b modificado (ambos previamente digeridos y purificados), fueron empleados para llevar a cabo la reacción de ligación.

Dicha reacción productos fueron ligados con la enzima T4 Ligasa. Los volúmenes empleados para la reacción de ligación se muestran en el **Cuadro 17**. El protocolo empleado para la reacción de ligación fue el sugerido por la casa comercial de la enzima T4ligasa. En un tubo eppendorf de 1.5 ml fueron añadidos cada uno de los reactivos mostrados en el **Cuadro 17**, la reacción de ligación se incubó a 4 °C durante toda la noche.

Cuadro 17. Reacción de ligación pET-19b modificado::hpeno.

Reactivo	Volumen (µl)
T4 DNA Ligasa Buffer 10X	1.0
pET19b modificado	3.0
Inserto Hpeno	5.0
H ₂ O	--
T4 DNA Ligasa	1.0

6.2.4.5 Transformación de células DH5αTM

Células calcio-competentes de *E. coli* DH5αTM fueron transformadas con el producto de la reacción de ligación pET-19b modificado::hpeno. La transformación de las células *E. coli* DH5αTM se realizó siguiendo el protocolo transformación de células descrito anteriormente.

6.2.4.6 Confirmación de colonias

Las colonias de *E. coli* DH5αTM transformadas con el vector de clonación (pET-19b modificado::hpeno) fueron confirmadas mediante una reacción de PCR en colonia. El protocolo de la reacción de PCR en colonia se describió a detalle anteriormente.

6.2.4.7 Extracción de ADN plasmídico

Se seleccionaron 2 de las colonias transformadas de *E. coli* DH5αTM positivas en la PCR en colonia. Las colonias se inocularon en medio LB líquido con ampicilina [100 µg/ml] y se incubaron a 37 °C a 150 rpm durante toda la noche.

Posteriormente se realizó la extracción del ADN plasmídico (pET-19b modificado::hpeno) de las células *E. coli* DH5 α TM transformadas. En la extracción del ADN plasmídico se empleó el estuche comercial QIAprep Spin Miniprep de la casa comercial QIAGEN utilizando el protocolo propuesto por el estuche, el cual fue descrito anteriormente.

6.2.4.8 Verificación de inserto

La verificación del inserto hpeno en el vector de expresión pET-19b modificado se llevó a cabo mediante la digestión del vector pET-19b modificado::hpeno y la secuenciación del inserto hpeno.

La digestión del plásmido pET-19b modificado::hpeno se llevó a cabo con las enzimas de restricción NdeI y XhoI de la casa comercial Promega. Los sitios de restricción para dichas enzimas fueron adicionados a la secuencia de los oligonucleótidos diseñados (**Cuadro 5**). En un tubo eppendorf de 1.5 ml se añadieron uno a uno los reactivos mostrados en el **Cuadro 18**. La reacción de digestión se incubó a 37 °C durante 1 h, posteriormente la reacción de digestión se detuvo añadiendo 2 μ l de EDTA 0.5M. La verificación de los resultados de la reacción de digestión se realizó mediante electroforesis horizontal. En la electroforesis horizontal 2 μ l de la reacción de digestión y 1 μ l de SYBR Gold fueron depositados en un gel de agarosa 0.7 %. El gel se corrió durante 1 h a 90 V. Una vez finalizada la separación electroforética, el gel se visualizó en un transiluminador ultravioleta y los resultados fueron capturados fotográficamente con un fotodocumentador Kodak Digital Science 1D.

El inserto del gen hpeno en el vector de expresión también fue verificado mediante secuenciación, que se llevó a cabo en un secuenciador ABI Prism AB3130 (Applied Biosistem, USA). Se realizaron dos reacciones de secuenciación independientes, en ellas se emplearon los iniciadores de la región del promotor T7 del vector pET-19b. En la reacción sentido (5' a 3') se utilizó el iniciador T7F y en la reacción contrasentido (3'a5') el iniciador T7R (**Cuadro 19**). Todos los reactivos y concentraciones utilizados en la reacción de secuenciación se muestran en el **Cuadro 20**. Las condiciones de amplificación de la reacción de secuenciación se muestran en el **Cuadro 15**.

Cuadro 18. Mezcla de reacción digestión de pET-19b_modificado::hpeno.

Reactivo	Concentración	Concentración final	Volumen (µl)
Buffer D	10.0 X	1.0 X	2.0
H ₂ O mQ	---	---	13.0
NdeI	10.0 U/µl	0.5 U	1.0
XhoI	10.0 U/µl	0.5	1.0
pET-19b_modificado::hpeno	10.0 µg	1.5 µg	3.0

Cuadro 19. Oligonucleótidos de región promotora de pET-19b.

Nombre	Secuencia
T7F	TAATACGACTCACTATAGGG
T7R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Cuadro 20. Reacción de secuenciación de inserto en pET-19b_modificado::hpeno.

Reactivo	Concentración	Concentración final	Volumen (µl)
Buffer bigdye v3.1	5.0 X	1.0 X	4.0
H ₂ O mQ	5.0 µM	1.0 µM	9.0
Oligo T7F o T7R	5.0 µM	1.0 µM	1.0
BigDye v3.1 ready mix	2.5 X	1.0 X	1.0
pET-19b_modificado::hpeno	300.0 ng	30.0 ng	2.0

Una vez finalizada la amplificación el producto de PCR para la reacción de secuenciación del vector de clonación se purificó como se describió anteriormente y se llevó a secuenciar. Las secuencias fueron analizadas utilizando la herramienta BLAST del NCBI.

6.2.5 Obtención de la proteína recombinante enolasa de *H. pylori*

6.2.5.1 Transformación de células *E. coli* Rosetta-gami

Se transformaron células calcio-competentes de *E. coli* Rosetta-gami con la construcción del vector de expresión (pET-19b modificado::hpeno), siguiendo el protocolo de transformación descrito anteriormente.

6.2.5.2 Expresión de la proteína recombinante enolasa de *H. pylori*

Se estandarizaron las condiciones expresión de la proteína recombinante enolasa de *H. pylori* (hpENO). El protocolo utilizado se describe a continuación, a partir de una sola colonia recombinante de *E. coli* Rosetta-gami se preparó un pre-cultivo en un matraz Erlenmeyer de 50 ml se adicionaron 25ml de medio 2xYT, 100 µg/ml de ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol, posteriormente el matraz se incubó a 37 °C a 150 rpm en una incubadora Thermo Scientific, modelo 435 durante 18 h. Al día siguiente se inoculó un matraz con 500 ml de medio 2xYT, 100 µg/ml de ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol con 25 ml del pre cultivo celular. Posteriormente se incubó el matraz con cultivo a una temperatura constante de 37 °C y a 200 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0.6 y 0.8. Una vez alcanzada la OD₆₀₀ deseada, se tomó una alícuota de 1 ml se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla se almacenaron a -20 °C (Muestra T₀). Para inducir la producción de la enzima recombinante hpENO, se agregó al matraz con el cultivo IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó por 4 h a 37 °C y 200 rpm. Terminado el tiempo de inducción, nuevamente se tomó una alícuota de 1 ml de cultivo y se le dio el mismo tratamiento que a la muestra de T₀ (Muestra T₄). El resto del cultivo bacteriano se centrifugó a 9,000 rpm durante 30 min a 4 °C, finalmente se descartó el sobrenadante y el sedimento celular fue almacenado a -80 °C hasta su uso. Como control de expresión se usaron células sin transformar de *E. coli* Rosetta-gami. Se verificó la expresión de la proteína por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida.

6.2.6 Electroforesis vertical SDS-PAGE

La técnica de SDS-PAGE posee un alto poder de resolución. Lo anterior se deriva del uso de un sistema electroforético discontinuo, formado de dos geles de distinta porosidad y pH, en el gel superior o compactador primero se compactan las muestras y luego en el gel inferior o separador las muestras se separan. Para la elaboración de los geles SDS PAGE se siguió el protocolo propuesto por Laemmli (Laemmli 1970) que a continuación se describe: el gel separador se preparó primero, los reactivos y cantidades empleados se describen en el **Cuadro 21**, se dejó solidificar el gel durante 40 min, posteriormente se preparó el gel concentrador y se añadió en la parte superior del primer gel, una vez que transcurrió el tiempo para la solidificación del gel, la base fue montada en una cámara de electroforesis vertical con el tampón de corrida.

Cuadro 21. Reactivos para preparación de geles acrilamida:bisacrilamida (29:1).

Reactivo	Gel separador 12% (μ l)	Gel concentrador 5% (μ l)
Acrilamida-Bisacrilamida 29:1	6,000 μ l	650 μ l
H ₂ O desionizada	5,250 μ l	3,000 μ l
Tris 4X Cl/SDS pH 8.8	3,650 μ l	-----
Tris 4X Cl/SDS pH 6.8	-----	1,250 μ l
Persulfato de Amonio 10 %	50 μ l	25 μ l
TEMED	10 μ l	5 μ l

6.2.6 Extracción de proteínas de cuerpos de inclusión

Se tomó una pastilla congelada de 500 ml de cultivo, se descongeló en hielo y se re suspendió en 25 ml de buffer de resuspensión (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM KCl y 0.1 mM PMSF), se sonicó a una amplitud de 50 %, 12 ciclos de 10 s con descanso de 20 s, después se adicionó 1 mM de MgSO₄ y 0.1 mg/ml de lisozima de huevo blanco de pollo (Sigma, USA), se incubó por 20 min a T_{amb} en agitación, posteriormente se centrifugó a 9,000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 25 ml de Buffer de lavado 1 (1 % v/v Tritón X-100/50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA y 0.1 mM PMSF) se

sonicó nuevamente con condiciones dadas anteriormente, se agregó 1 mM de MgSO_4 , y 0.1 mg/ml de lisozima de pollo y se incubó a T_{amb} por 20 min en agitación, a continuación se centrifugó a 9,000 rpm durante 20 min a 4 °C, se descartó sobrenadante. La pastilla se re-suspendió en 25 ml de Buffer de lavado 2 (1%v/v Tritón X-100/50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM PMSF), se incubó por 20 min a T_{amb} con agitación, posteriormente se centrifugó a 9,000 rpm durante 20 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante. La pastilla se re-suspendió en 25 ml de Buffer de lavado 3 (H₂O mQ, 0.1 mM PMSF), se incubó por 20min a T_{amb} en agitación y se centrifugó por 20 min a 9,000 rpm a 4 °C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se re suspendió en 25 ml de Solución de Urea (8 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM PMSF), se incubó por 4 h a T_{amb} en agitación, posteriormente se centrifugó por 30 min a 9,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se guardó a 4 °C hasta su uso. La integridad del extracto de cuerpos de inclusión fue verificada por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %.

6.2.7 Cromatografía por afinidad a níquel

Haciendo uso de la afinidad del tracto de histidinas añadida a la proteína recombinante hpENO al níquel, se empacaron columnas de vidrio con 4ml de resina Ni-NTA agarosa de la casa comercial QIAGEN. La resina se lavó con 10 volumen de columna (VC) de H₂O des ionizada y filtrada, posteriormente se equilibró con 10 VC de Buffer de unión (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM KCl, 10mM imidazol). Se adiciono al extracto de proteínas de cuerpos de inclusión 10 mM de imidazol, se filtró y se agregó a la columna empacada, se dejó interaccionar la muestra con la resina a T_{amb} por 2 h en agitación. Posteriormente se recolectó el flujo que paso por la columna, se lavó con 10 VC de Buffer de lavado (50mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM KCl, 50 mM imidazol) y se desprendió la proteína de la columna con 5 VC de Buffer de elución (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM KCl, 300 mM imidazol), posteriormente la columna se lavó con 15 VC de H₂O y 2 VC de etanol 20 %, y se guardó en etanol 20 % a 4 °C.

6.2.8 Eliminación del tracto de histidinas

6.2.8.1 Expresión y purificación de PreScission Protease (PSP)

Se transformaron células de *E. coli* Rosetta-gami con la construcción vector:::psp, se seleccionó una colonia recombinante y se preparó un pre-cultivo inoculando un matraz Erlenmeyer con 20 ml de medio líquido LB y 100 µg/ml de ampicilina. El matraz se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. El día siguiente dos matraces Erlenmeyer con 500 ml de medio de cultivo líquido LB y 100 µg/ml de ampicilina fueron inoculados con 10 ml del pre-cultivo, posteriormente los matraces fueron incubados a 37 °C y 200 rpm hasta tener un cultivo con una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.7. Una vez obtenida la OD de cultivo se añadió IPTG para una concentración final de 1 mM y se incubó por 3 h el cultivo para la producción de la proteína recombinante PSP. Para obtener el precipitado celular una vez finalizado el tiempo de incubación el cultivo se centrifugó durante 30 min a 4 °C y 9,000 rpm, el sobrenadante se descartó y la pastilla se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Para la purificación de la PSP recombinante se descongeló en hielo una pastilla proveniente de 500 ml de cultivo, posteriormente se re-suspendió en 7.5 ml de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 20% Glicerol, 10 mM ácido etileno diamino tetraacético, 1 mM Ditioneitol [DTT]), se adicionaron 300 µl de lisozima de huevo blanco de pollo (25 µg/ml) y se incubó en hielo durante 45 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó a la mezcla 75 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM, posteriormente se congeló rápidamente el lisado en nitrógeno líquido, inmediatamente después se descongeló en agua a temperatura ambiente y se centrifugó a durante 30 min a 4 °C y 9,000 rpm

6.2.8.2 Corte del tracto de histidinas

La proteína purificada hpENO se colocó en una bolsa de diálisis y se adicionó la enzima PSP (200 µl por cada 20 ml de extracto de hpENO), 1mM EDTA y 1 mM DTT. Posteriormente la bolsa de diálisis se depositó en un vaso de precipitado con 500 ml de Buffer de corte (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM KCl), se incubó a 4 °C en agitación durante 16 hr.

6.2.9 Purificación de *hpENO* cortada

La mezcla de *hpENO* con y sin etiqueta de histidinas y PSP se pasó a través de una columna empacada con Glutación Sepharose (GE Healthcare) para suscitar la unión de PSP a la resina. Inmediatamente, la desnaturalización de la proteína fue inducida con urea 8 M y, finalmente, la mezcla de *hpENO* con y sin etiqueta de histidinas se hizo pasar por una columna empacada con resina NTA- Ni (QIAGEN). La *hpENO* sin etiqueta de histidina se recuperó en la fracción del flujo a través de la columna y la *hpENO* con tracto de histidinas se eluyó con el tampón de elución. La proteína purificada fue almacenada a 4 °C hasta su uso.

6.2.10 Preparación de la muestra *hpENO*

La proteína se dializó en una solución tampón 50 mM a pH 8.0 de tris-HCl, tris-acetatos o fosfato de potasio (según se requiriera), realizando cambio de tampón cada 4 h. Se realizaron como mínimo tres cambios de tampón. Finalizado proceso de diálisis la proteína se filtró por centrifugación a 6,000 rpm y se concentró hasta 60 µg/ml aproximadamente.

6.2.11 Caracterización estructural de proteína recombinante *hpENO*

6.2.11.1 Caracterización de estructura primaria

Las secuencias de aminoácidos de enolasa de *H. pylori* y otras enolasas de origen procariota y eucariotas se obtuvieron de la base de datos de NCBI. Se realizó un alineamiento de secuencia múltiple con el software SeaView (Galtier et al., 1996) y se utilizó el programa GeneDoc para visualizar y analizar los resultados del alineamiento.

6.2.11.2 Caracterización de estructura secundaria

El dicroísmo circular (DC) se basa en la absorción diferencial de izquierda y radiación derecha polarizada circularmente por cromóforos que poseen quiralidad intrínseca o que se encuentran en ambientes quirales. Las proteínas poseen una serie de cromóforos que pueden dar lugar a señales de DC, en la región UV-lejano (240-

180 nm), que corresponde a la absorción del enlace peptídico. Es por ello que mediante el análisis del espectro de DC se puede obtener información referente a las características estructurales secundarias, como la α -hélice y β -hoja (Kelly and Price 2000). En la **Figura 11** se muestran los espectros característicos asociados a las estructuras secundarias.

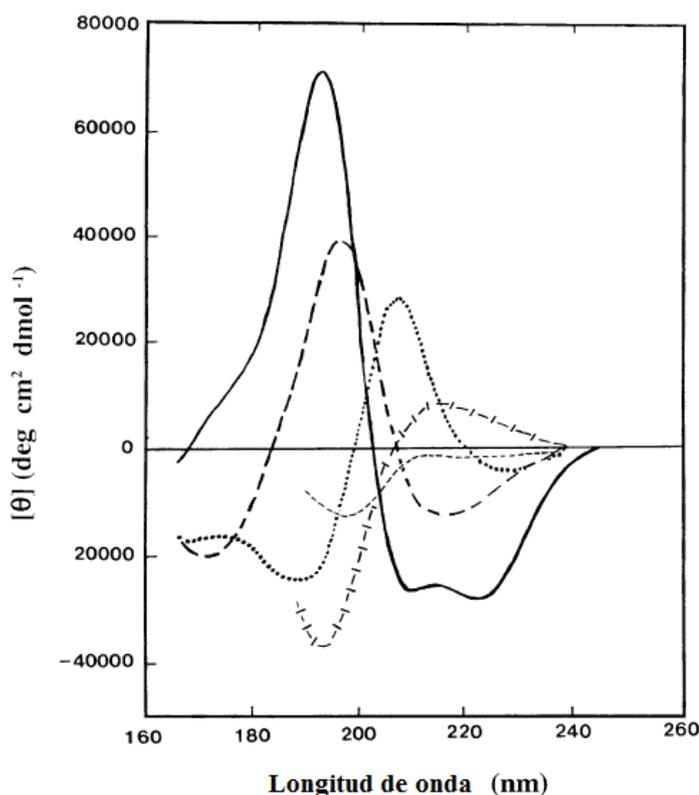


Figura 11. Espectros de DC UV-lejano asociados con los tipos de estructura secundaria.

α -hélice: línea continua, hoja β anti-paralela: línea discontinua larga, giro β tipo I: línea de puntos, hélice 3_1 extendida o hélice II poli (Prolina): línea discontinua cruzada, estructura irregular: línea discontinua corta.

(Kelly et al. 2005)

El DC es una técnica versátil en biología estructural, con una gama cada vez más amplia de aplicaciones, en la actualidad esta técnica es muy valiosa para examinar la estructura secundaria, las propiedades de plegamiento, para evaluar la integridad estructural y para seguir el despliegue/plegamiento en función de la temperatura de las proteínas en solución (obtenidas mediante técnicas recombinantes o bien purificadas de tejidos) (Greenfield 2006b; Kelly et al. 2005; Kelly and Price 2000).

La enolasa recombinante se analizó por dicroísmo circular (DC) usando un espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Inc., Easton, MD) equipado con un soporte de célula de tipo Peltier PFD-425S para el control de temperatura y agitación magnética. Los espectros de DC se registraron utilizando celdas de 0.1cm y las lecturas fueron tomadas en un rango de longitud de onda de 200-250 nm. La elipticidad es reportada como la elipticidad por residuo medio $[\theta]$ (Greenfield 2006b).

6.2.11.3 Caracterización de estructura terciaria

La espectroscopia de fluorescencia se basa en la fluorescencia intrínseca de las proteínas, existen tres aminoácidos aromáticos fluorescentes: fenilalanina, tirosina y triptófano, aunque el principal contribuyente de fluorescencia es el triptófano. No obstante, estos tres aminoácidos son relativamente escasos en las proteínas, aunque esto en realidad facilita la interpretación de los espectros de fluorescencia obtenidos. Los cambios en los espectros de emisión de fluorescencia ocurren en respuesta a transiciones conformacionales, asociación de subunidades, unión a sustratos o desnaturalización de la proteína (Lakowicz 2006).

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron usando un espectrofluorómetro modelo LS-55 (Perkin-Elmer), equipado con un soporte de celda con camisa de agua para control de la temperatura. Todos los experimentos se realizaron con células con una longitud de trayectoria de 1.0 cm, a 25 °C. La excitación de longitud de onda fueron 280 nm y 295 nm.

6.2.12 Desplegamiento térmico

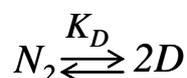
La estabilidad térmica de apo y holo-enolasa se analizaron mediante desplegamiento térmico (desnaturalización inducida por la temperatura). El desplegamiento térmico de la apo y holo-hpENO se analizó mediante dicroísmo circular (DC) usando un espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Inc., Easton, MD). Los cambios de señal de DC por efecto del calentamiento de la muestra se registraron utilizando celdas de 1.0 cm y las lecturas fueron tomadas a una longitud de onda de 220 nm. El desplegamiento se inició a 25 °C y el equipo se programó para realizar

incrementos constantes de temperatura hasta llegar a 95 °C. La elipticidad es reportada como la elipticidad por residuo medio [θ].

Los cambios de estructura secundaria durante el enfriamiento se registraron después de que las transiciones de desnaturalización se habían completado y la proteína se enfriaba hasta regresar a su temperatura inicial de 25 °C. Las temperaturas de la muestra dentro de la celda se registraron con la sonda de soporte externa.

En los ensayos realizados las muestras de enolasa (hpENO) se prepararon a una concentración de 0.060 mg ml⁻¹. Se emplearon tres tampones diferentes en las evaluaciones: Tris-acetato, Tris-HCl y fosfato de potasio, 50 mM y a pH de 7,4. En algunos experimentos, las soluciones se complementaron con MgCl₂ 2 mM o EDTA 1 mM como se establece (Moreno-Vargas et al. 2011; Pal-Bhowmick et al. 2007).

Dado que las transiciones de desnaturalización de hpENO no muestran la aparición de intermedios detectables, estos datos se analizaron usando el modelo de desnaturalización de dos estados para una proteína dímera, donde las únicas especies detectables son el dímero nativo (N₂) y los monómeros desplegados (D), de acuerdo a:



En este caso, la constante de equilibrio K_D se define como:

$$K_D = \frac{[D]^2}{[N_2]}$$

y la concentración total de proteína en términos de monómero, P_t, es

$$P_t = 2[N_2] + [D]$$

La fracción de monómeros implicados en dímeros nativos, f_{N_2} se da como $f_{N_2} = 1 - f_D$, donde f_D es la fracción de monómeros desplegados, y

$$f_{N_2} = \frac{2[N_2]}{P_t}$$

$$f_D = \frac{[D]}{P_t}$$

Por lo tanto,

$$K_D = \frac{[D]^2}{[N_2]} = 2P_t \frac{f_D^2}{f_N}$$

La constante de equilibrio puede expresarse en función de la temperatura. Fuera de la región de transición, la señal de DC de las especies nativas y desnaturalizadas varían linealmente con la temperatura; por lo tanto, es posible estimar por extrapolación su valor a cada temperatura. La entalpía de desnaturalización (ΔH_D) se obtuvo al trazar en K_D versus T de acuerdo con la ecuación de van't Hoff:

$$\Delta H_D(T) = -R \left[\frac{\partial \ln K_D}{\partial (1/T)} \right] = RT^2 \left[\frac{\partial \ln K_D}{\partial T} \right] \frac{\Delta H(T)}{RT^2} \quad \square$$

donde Tm es el punto medio de la desnaturalización térmica. Las gráficas de van't Hoff (en K_D vs $1/T$) de desnaturalización térmica son aproximadamente lineales a través del intervalo de temperaturas estudiadas, lo que permite una estimación de la entalpía asociada a la reacción de desplegamiento térmico de la enolasa.

6.2.13 Cinéticas de desplegamiento

Las cinéticas de des-plegamiento térmico de la holo-hpENO se realizaron mediante dicroísmo circular (DC) empleando un espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Inc., Easton, MD). Las cinéticas del desplegamiento de DC se registraron utilizando celdas de 1.0 cm. Para ello se seleccionaron previamente cinco temperaturas cercanas a la fase exponencial del desplegamiento de la proteína. Los cambios en la estructura de la enzima fueron leídos a 220 nm, y los experimentos se llevaron a cabo en una solución de Tris-HCl 50 mM a pH 7.4 con complementado con una solución de Mg^{2+} 4 mM.

6.2.13.1 Entalpía de activación (ΔH^\ddagger)

Los datos de las curvas cinéticas de des-plegamiento se ajustaron a ecuaciones de decaimiento exponencial individuales ($\theta = \theta_f + A_1 \exp [-k_1 t]$); donde θ es la señal del DC medida en el tiempo t , θ_f es la señal de CD final, el valor A_1 representa la amplitud de la curva exponencial, y, k_1 es la constante de velocidad de desplegamiento de la reacción. La dependencia de las constantes de velocidad en la temperatura se evaluó trazando la $\ln(k_1 / T)$ frente a $1 / T$, que representa la ecuación de Eyring.

$$\ln \frac{k_1}{T} = \ln \left(\frac{k_B}{h} \right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}$$

donde k_B ($1.3807 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$) y h ($6.62 \times 10^{-34} \text{ J}$) son las constantes de Boltzman y Planck respectivamente, ΔS^\ddagger y ΔH^\ddagger son la entropía y la entalpía de activación respectivamente. (Greenfield 2006a).

6.2.14 Actividad catalítica

Las reacciones acopladas de la piruvato cinasa muscular de conejo (PYK) y la lactato deshidrogenasa de corazón (LDH) se usaron para probar la actividad de la enolasa recombinante de la hpENO. La reacción se siguió midiendo la disminución de la absorbancia de NADH a 340 nm, esto mediante el empleo de un espectrofotómetro Scinco S-3100 UV-Vis. Los ensayos de actividad estándar se realizaron a 25°C en una mezcla de reacción de 1,0 ml que contenía 81 mM de trietanolamina / HCl, pH 7,6, 1,9 mM de 2-PGA, 1,3 mM de ADP, 0,12 mM de β -NADH, 0,5 mM de MgSO_4 y 25 mM de KCl. Las enzimas auxiliares PYK y LDH se usaron en concentraciones finales de 7 y 10 U ml⁻¹, respectivamente. Todos los reactivos fueron adquiridos en la casa comercial Sigma, las concentraciones y el protocolo seguido para la determinación de la actividad de la hpENO fue el sugerido por la misma casa comercial. La enolasa recombinante se añadió a una concentración final de 400 ng ml⁻¹ (Hannaert et al. 2003).

Se realizaron experimentos de control positivo usando de 0,025 a 0,05 unidades de enolasa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (ScEno), adquirida a Sigma, sin ninguna purificación adicional.

6.2.15 Determinación de sitios blancos de *hpENO*

Dada la alta similitud de secuencia de las proteínas enolasas, la búsqueda de sitios blancos en *hpENO* implicó el uso de dos programas. Como primer paso fue empleado el programa Molecular Operating Environment (MOE) versión 2008.10 (Merz et al. 2010), este programa ofrece una función conocida como “selección de sitios”, con esta función el programa realiza un análisis en toda la superficie de la proteína y revela los “huecos” en la proteína con capacidad de unión de compuestos. Una vez identificados los “huecos” o sitios blancos de la *hpENO* se realizó un filtrado de dichos sitios empleando el análisis bioinformático del alineamiento múltiple de las secuencias de enolasas reportadas. Con estos datos se seleccionaron únicamente los sitios de unión en los que se presentaban más aminoácidos únicos en la secuencia de *hpENO*, esto nos permite aumentar la probabilidad de unión específica de los compuestos a la enolasa de *H. pylori*.

7. RESULTADOS

7.1 Amplificación del gen de la enolasa de *H. pylori*

El gen de la enolasa dentro del género *Helicobacter* se encuentra presente en todas las especies y tiene un grado alto de conservación. La amplificación del gen de la enolasa de *H. pylori* (*hpeno*) mediante PCR convencional dió como resultado un producto de PCR con el tamaño de banda esperado (~1,281 pb), con un contenido de GC de 43.56 %. Esto corresponde con el tamaño estimado para este gen y con las estimaciones del contenido de GC del genoma de *H. pylori* (**Figura 12**).

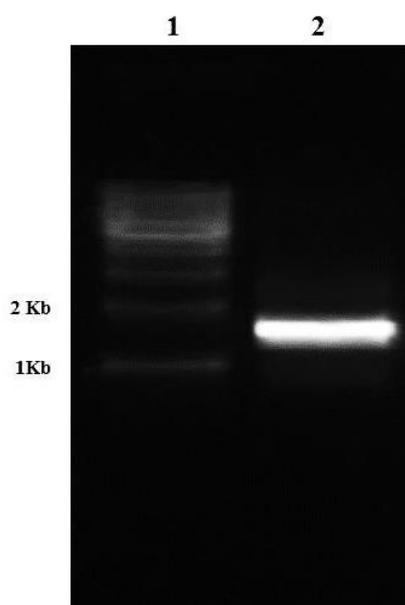


Figura 12. Amplificación de gen enolasa de *H. pylori* (*hpeno*).

En el primer carril corresponde al marcador 1 kb Ladder DNA step, en el segundo carril se muestra la amplificación del gen enolasa de *H. pylori*.

7.2. Construcción de vector de clonación (pGEM[®]-T Easy::*hpeno*) y vector de expresión (pET-19b modificado::*hpeno*)

El gen amplificado de la enolasa de *H. pylori* (*hpeno*) fue ligado en el vector pGEM[®]-T Easy exitosamente. Con la construcción del vector de clonación producto de la reacción de ligación (pGEM[®]-T Easy::*hpeno*), se transformaron células calcio competentes de *E. coli* DH5 α TM. Dichas células mostraron una alta eficiencia y eficacia de transformación, ya que en la reacción de transformación se obtuvieron una gran cantidad de colonias transformadas con el vector.

Gracias a las características del vector pGEM®-T Easy que permite distinguir visualmente las colonias que contienen el inserto (colonias blancas) de las colonias que no lo contienen (colonias azules), se realizó un primer cribado de las colonias. Las colonias con el inserto seleccionadas fueron verificadas mediante una reacción de PCR en colonia. En la **Figura 13** se puede observar el resultado de la PCR en colonia de algunas de las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector de clonación (pGEM®-T Easy::hpeno).

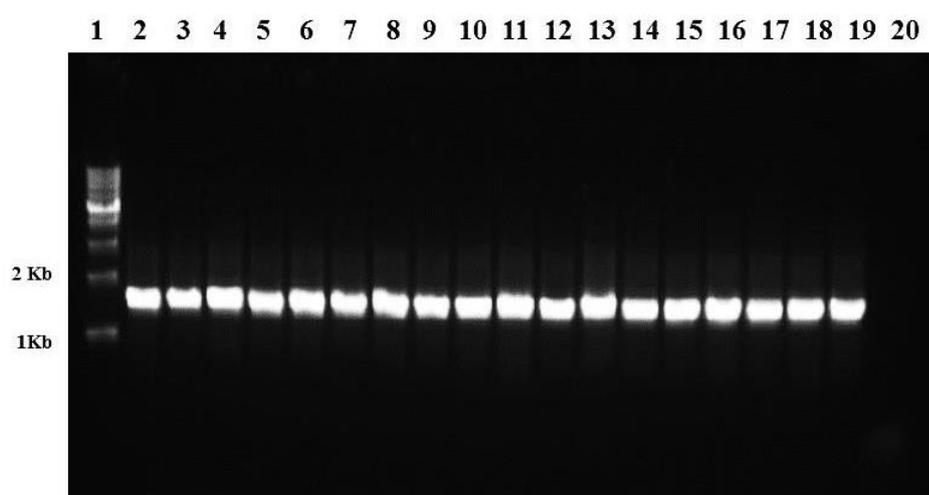


Figura 13. PCR en colonia de transformantes de *E. coli* DH5 α ™ con pGEM®-T Easy::hpeno.

En el primer carril se muestra el marcador molecular de 1 Kb Ladder DNA step, del segundo al decimonoveno carril se muestra el producto de PCR *eno* a partir de colonias transformadas con pET-19b::hpeno, finalmente en el carril vigésimo se muestra el control negativo de la reacción.

La transformante de *E. coli* DH5 α ™ seleccionada fue empleada exitosamente para el cultivo y multiplicación celular de la cepa transformada. La transformación de la cepa con el vector no afectó las habilidades de crecimiento de la cepa, a partir del cultivo celular obtuvimos el ADN plasmídico (pGEM®-T Easy::hpeno). Este material genético se empleó en la reacción de digestión enzimática con las enzimas NdeI y XhoI. En el Panel A de la **Figura 14**, podemos observar la liberación exitosa de inserto hpeno producida con la reacción de ligación a partir de la construcción del vector de clonación (pGEM®-T Easy::hpeno).

El inserto liberado fue eficazmente purificado para su sub-clonación en el vector de expresión. Para dicho proceso se llevó a cabo una reacción de ligación con

el vector pET-19b modificado y el gen *hpeno*, ambos previamente digeridos y purificados. Con el producto de la reacción de ligación (pET-19b modificado::*hpeno*) se realizó transformación de células de *E. coli* DH5a. La sub-clonación del inserto se llevó a cabo exitosamente. La eficiencia de transformación del vector de expresión fue significativamente menor a la mostrada por el vector de clonación. El número total de transformantes fueron analizadas mediante PCR en colonia, con ello se logró la verificación de la presencia del inserto en la colonia. Posterior a la verificación del inserto se realizó el cultivo de la cepa y su subsecuente extracción de ADN genómico a partir del cual también se verificó la presencia del inserto en el vector mediante una reacción de ligación. En el Panel B de la **Figura 14**, podemos observar la liberación exitosa de inserto *hpeno* producida con la reacción de ligación a partir del vector de expresión (pET-19b modificado::*hpeno*).

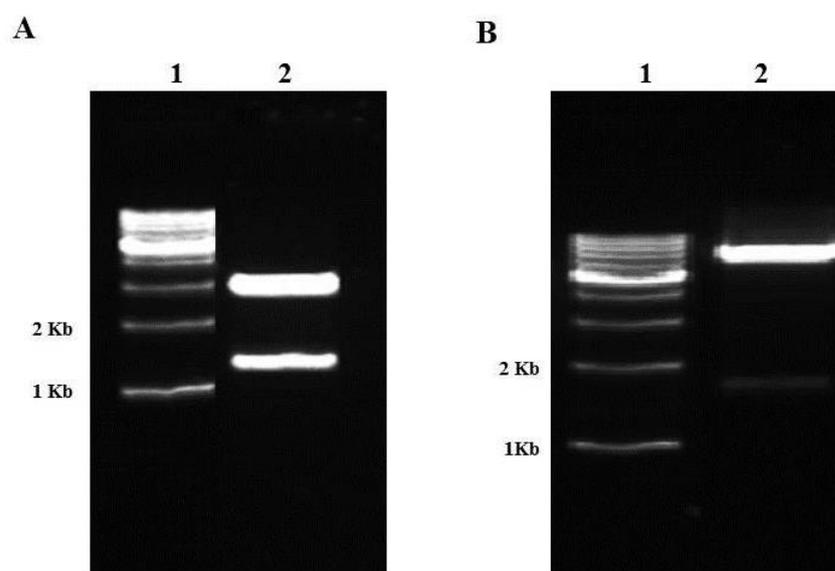


Figura 14. Verificación de inserto *hpeno* en vectores por reacción de digestión.

Panel A: Liberación de inserto *hpeno* de vector de clonación pGEM@-T Easy, **Panel B:** Liberación de inserto *hpeno* de vector de expresión pET-19b modificado. El primer carril de cada panel corresponde al marcador 1 kb Ladder DNA step, el segundo carril corresponde al producto de digestión del inserto y el vector correspondiente.

La reacción de secuenciación de los insertos del vector de clonación y del vector de expresión dio como resultado secuencias de buena calidad, con un LOR (Longitud de lectura) alto. Para cada uno de los insertos se realizó la reacción de secuenciación sentido y contrasentido, con los oligonucleótidos del promotor

correspondiente a cada vector. En general las secuencias nucleotídicas obtenidas tuvieron una longitud aproximada de 900 pb cada uno. En la **Figura 15** se muestra una pequeña sección de la secuencia nucleotídica obtenida para el gen *hpeno* insertado en el vector de expresión.

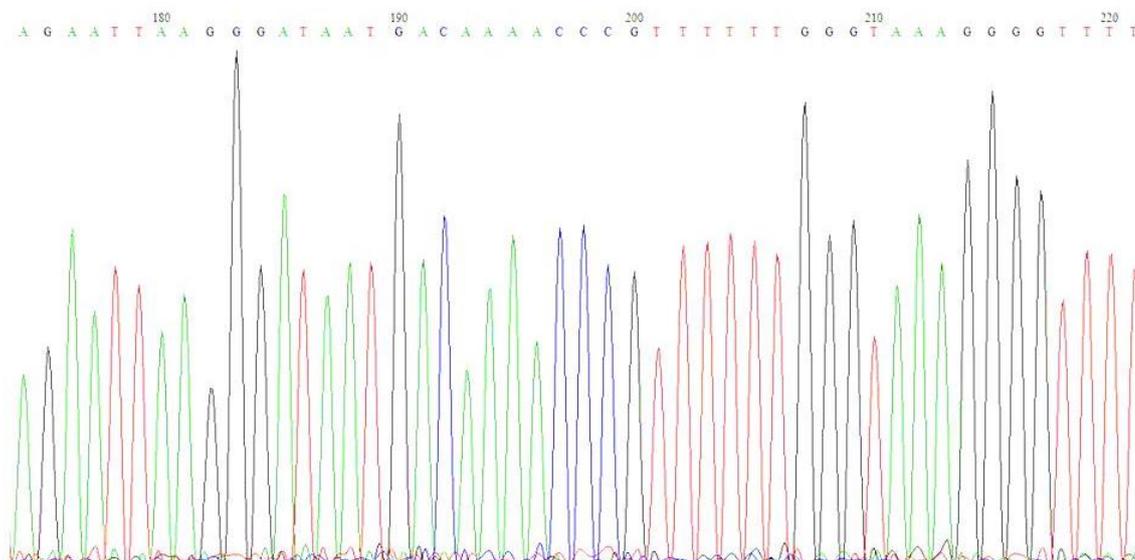


Figura 15. Cromatograma de secuencia de inserto *hpeno*.

Fragmento de cromatograma correspondiente a la secuencia nucleotídica obtenida para la región del inserto *hpeno*.

La identidad de secuencia resultante entre la el inserto *hpeno* en el vector de expresión y la enzima enolasa de *H. pylori* 26695 reportada en el NCBI (CP003904.1) fue de 99%. Este porcentaje de identidad es resultado de dos cambios presentes en la secuencia nucleotídica del inserto *hpeno*, estos cambios se presentaron en el inserto de ambas construcciones realizadas (pGEM®-T Easy::*hpeno* y pET-19b modificado::*hpeno*). En la **Figura 16** se muestra una región del alineamiento realizado en la plataforma de NCBI.

Los cambios de nucleótidos presentes en la secuencia del inserto *hpeno*, no alteraron la secuencia aminoacídica reportada para la enzima hpENO. En la **Figura 17** se aprecia el alineamiento realizado con la traducción de la secuencia nucleotídica del inserto *hpeno* y la secuencia aminoacídica de la enzima enolasa de *H. pylori* 26695 reportada en el NCBI (AFV41375.1). La identidad obtenida en el alineamiento de dichas secuencias fue de 100 %.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2355 bits(1275)	0.0	1279/1281(99%)	0/1281(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCTAACCATTAAGATATTCATGCTTTAGAAGTGATGGATAGTAGGGGCAATCCTACC			60
Sbjct 163985	ATGCTAACCATTAAGATATTCATGCTTTAGAAGTGATGGATAGTAGGGGCAATCCTACC			164044
Query 61	ATTCAAGCCAGCGTGGTTTTGAGCGATAACACTAAGGCGAGCGGATTGTGCCTAGCGGG			120
Sbjct 164045	ATTCAAGCCAGCGTGGTTTTGAGCGATAACACTAAGGCGAGCGGATTGTGCCTAGCGGG			164104
Query 121	GCGAGCACCGGTAAGAGAGAAGCGTTAGAATTAAGGGATAATGACAAAACCGTTTTTTG			180
Sbjct 164105	GCGAGCACCGGTAAGAGAGAAGCGTTAGAATTAAGGGATAATGACAAAACCGTTTTTTG			164164
Query 181	GGTAAAGGGGTTTTAAGGGCATGCGAAAATGTCAATAGCGTGATCAAAACACCATTTAATA			240
Sbjct 164165	GGTAAAGGGGTTTTAAGGGCATGCGAAAATGTCAATAGCGTGATCAAAACACCATTTAATA			164224
Query 241	GGGCTTGAAGCGATCAATCAAGCTTTTGTAGATGAGAGGTTAAGGGCTTAGACGGCACG			300
Sbjct 164225	GGGCTTGAAGCGATCAATCAAGCTTTTGTAGATGAGAGGTTAAGGGCTTAGACGGCACG			164284
Query 301	CCTAATTACGCTAATTTAGGGGCGAACGCTGTTTTGGGCGTTTCTATGGCGTTAGCAAGG			360
Sbjct 164285	CCTAATTACGCTAATTTAGGGGCGAACGCTGTTTTGGGCGTTTCTATGGCGTTAGCAAGG			164344
Query 361	GCTAGCGCAAAGGCTTTAAATCTGCCATTATACCGCTATTTAAGGGGGCTAACGCTCTG			420
Sbjct 164345	GCTAGCGCAAAGGCTTTAAATCTGCCATTATACCGCTATTTAGGGGGGGCTAACGCTCTG			164404
Query 421	ACTTTGCCTGTGCCGATGCTCAATATCATCAACGGCGGAACGCATGCGAATAATCCATA			480
Sbjct 164405	ACTTTGCCTGTGCCGATGCTCAATATCATCAACGGCGGAACGCATGCGAATAATCCATA			164464
Query 481	GACTTTCAAGAATACATGATCATGCCTTTAGGGTTTAAAGTTTAAAGAAGCTTTAAGA			540
Sbjct 164465	GACTTTCAAGAATACATGATCATGCCTTTAGGGTTTAAAGTTTAAAGAAGCTTTAAGA			164524
Query 541	GCGAGCGCAGAAGTCTATCACACGCTTAAAAAAGCTTTTAGATGGGAAGAATCAGCTCACA			600
Sbjct 164525	GCGAGCGCAGAAGTCTATCACACGCTTAAAAAAGCTTTTAGATGGGAAGAATCAGCTCACA			164584
Query 601	AGCGTGGGCGATGAGGGGGGCTTTCGCGCTAATTTAGCAACAATGTAGAACCCTTGAA			660
Sbjct 164585	AGCGTGGGCGATGAGGGGGGCTTTCGCGCTAATTTAGCAACAATGTAGAACCCTTGAA			164644
Query 661	GTCATTTCTCAAGCCATTGAAAAAGCCGGCTATAAATTAGGCGAAGAAATAGCGCTCGCT			720
Sbjct 164645	GTCATTTCTCAAGCCATTGAAAAAGCCGGCTATAAATTAGGCGAAGAAATAGCGCTCGCT			164704
Query 721	TTAGATGTAGCGAGCAGCGAATTGGTGGATGAAAATTTCAATTACATTTAAAGGGTGAA			780
Sbjct 164705	TTAGATGTAGCGAGCAGCGAATTGGTGGATGAAAATTTCAATTACATTTAAAGGGTGAA			164764
Query 781	AATAAGATTCTAGATTCGCATGAATTGGTGGCTTATTATAAAGAGTTGGTGGCAAAATAC			840
Sbjct 164765	AATAAGATTCTAGATTCGCATGAATTGGTGGCTTATTATAAAGAGTTGGTGGCAAAATAC			164824

Figura 16. Fragmento de alineamiento entre las secuencias nucleotídicas del inserto hpeno y fragmento del genoma (gen eno) de *H. pylori* 26695.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
867 bits(2241)	0.0	Compositional matrix adjust.	426/426(100%)	426/426(100%)	0/426(0%)
Query 1	MLTIKDIHALVMDSRGNPTIQASVVLSDNTKASAIVPSGASTGKREALELRDNDKTRFL				60
Sbjct 1	MLTIKDIHALVMDSRGNPTIQASVVLSDNTKASAIVPSGASTGKREALELRDNDKTRFL				60
Query 61	GKGVLRACENVNSVIKHHLIGLEAINQAFVDERLRALDGTPTYANLGNANAVLGVSMALAR				120
Sbjct 61	GKGVLRACENVNSVIKHHLIGLEAINQAFVDERLRALDGTPTYANLGNANAVLGVSMALAR				120
Query 121	ASAKALNPLRYRLLGGANALTLVPVPLNIINGGTHANNSIDFQEYIMPLGFESFKEALR				180
Sbjct 121	ASAKALNPLRYRLLGGANALTLVPVPLNIINGGTHANNSIDFQEYIMPLGFESFKEALR				180
Query 181	ASAEVYHTLKKLLDGNQLTQSVGDEGGFAPNFSNNVEPLEVISQAIKAGYKLGEEIALA				240
Sbjct 181	ASAEVYHTLKKLLDGNQLTQSVGDEGGFAPNFSNNVEPLEVISQAIKAGYKLGEEIALA				240
Query 241	LDVASSELVDENFNYHLKGENKILDSHELVAAYKELVAKYPIVSIEDGLSEDDWEGWAF				300
Sbjct 241	LDVASSELVDENFNYHLKGENKILDSHELVAAYKELVAKYPIVSIEDGLSEDDWEGWAF				300
Query 301	SKELGRQIQLVGDDL FVTNASLLQKGIKNIANAVLIKPNQIGTISETLETIRLAKHHAY				360
Sbjct 301	SKELGRQIQLVGDDL FVTNASLLQKGIKNIANAVLIKPNQIGTISETLETIRLAKHHAY				360
Query 361	QCVMSHRSGESEDSEFIADFAVALNTGEIKTGSTARSERIAKYNRLLIEHELKGGIYIGK				420
Sbjct 361	QCVMSHRSGESEDSEFIADFAVALNTGEIKTGSTARSERIAKYNRLLIEHELKGGIYIGK				420
Query 421	ELFKHG	426			
Sbjct 421	ELFKHG	426			

Figura 17. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de inserto hpENO y de enzima enolasa de *H. pylori* 26695 (NCBI).

7.3 Obtención de la proteína recombinante enolasa de *H. pylori*

La expresión de la proteína enolasa de *H. pylori* (hpENO) resultó en la acumulación de la proteína en la fracción insoluble de *Escherichia coli*, es decir que el polipéptido fue secuestrado en agregados de proteínas (cuerpos de inclusión).

Se emplearon cuatro cepas de *E. coli*; BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3), Artic y Rosetta-gami para la producción de la proteína enolasa de *H. pylori*. En tres de las cepas evaluadas (BL21(DE3)pLysS, Artic y Rosetta-gami) se observó la producción la proteína hpENO, sin embargo en todas ella la proteína enolasa fue obtenida en cuerpos de inclusión. La cepa BL21(DE3)pLysS mostró una eficiencia de inducción considerablemente menor a las otras dos. En la **Figura 18** se puede observar las cinéticas de expresión de las cepas BL21(DE3)pLysS y Rosetta-gami.

Se seleccionó la cepa Rosetta-gami debido a que mostro mayor eficiencia de expresión y posee la capacidad de expresar codones raros, dichas características la convertían en la cepa ideal para la producción de la enzima hpENO. Las condiciones estandarizadas para la expresión de hpENO en la cepa *E. coli* Rosetta-gami, la cepa se creció en medio líquido 2xYT a 37 °C, una vez que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀

se adicionó 1 mM de IPTG para la inducción de la proteína durante 4 h. En la **Figura 19** se muestra la cinética de expresión de hpENO en *E. coli* Rosetta-gami, como se puede observar en el gel la mejor relación eficacia/eficiencia de expresión de hpENO se obtiene a las 4 h ya que la inducción durante toda la noche no logra un incremento en la producción de la hpENO pero si incrementa la producción de otras proteínas.

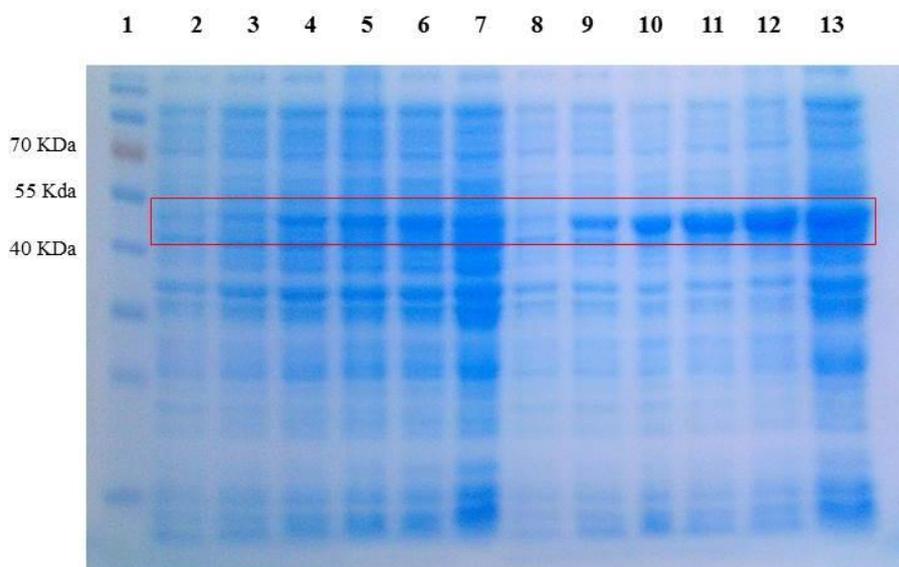


Figura 18. Cinética de expresión de hpENO en cepas de *E. coli*.

Marcador de proteína pre-teñido (7-175 kDa): carril 1, cinética de expresión en la cepa BL21(DE3)pLysS: carril 2-7, cinética de expresión en la cepa Rosetta-gami: carril 8-13.

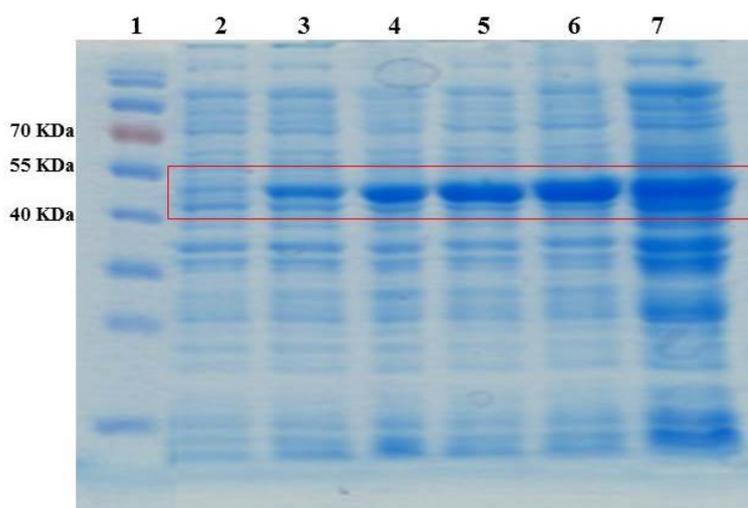


Figura 19. Expresión estandarizada de hpENO en *E. coli* Rosetta-gami.

Expresión de hpENO en cepa Rosetta-gami a 37 °C en medio líquido 2xYT con 1mM de IPTG. Marcador de proteína pre-teñido (7-175 kDa): carril 1, diferentes tiempos (h) de inducción de la proteína: T₀, T₁, T₂, T₃, T₄ y toda la noche: carril 2-7.

La solubilización de proteínas de cuerpos de inclusión requiere condiciones de desnaturalización fuertes, por lo que es necesario el uso de agentes caotrópicos tales como la urea y cloruro de guanidinio (GndCl). Para la solubilización de los cuerpos de inclusión de hpENO se empleó urea como agente desnaturalizante. Se evaluaron dos concentraciones de urea 4 M y 8 M para la solubilización de los cuerpos de inclusión. En la **Figura 20** se puede observar las bandas obtenidas en el proceso de obtención de proteínas de cuerpos de inclusión. Como se puede apreciar en el gel de acrilamida, la HpENO se obtuvo en el extracto de cuerpos de inclusión. Dicho extracto fue obtenido en sobrenadante después de la incubación en urea 8M (**Figura 20**, sexto carril).

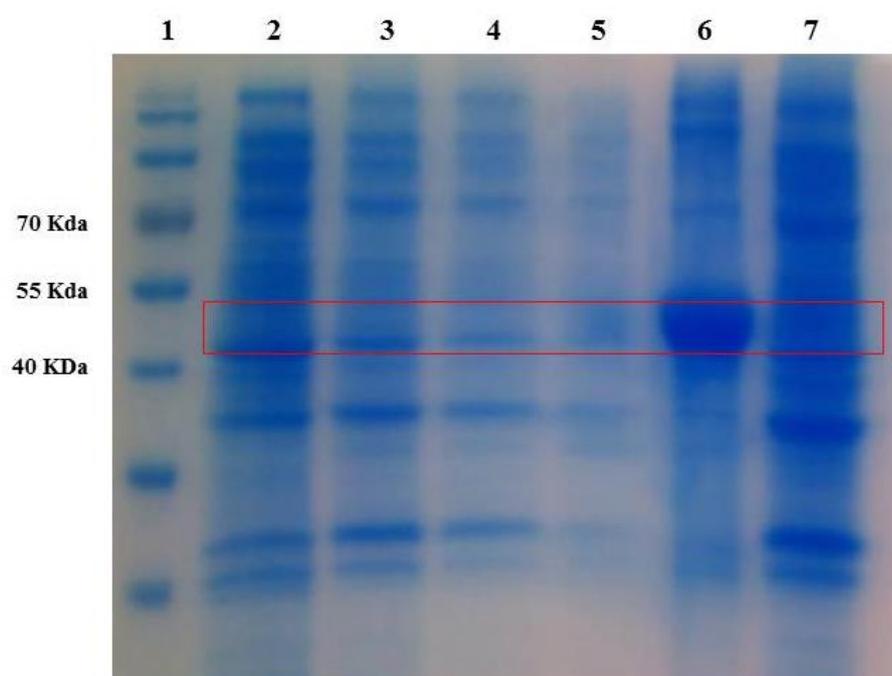


Figura 20. Obtención de proteínas de cuerpos de inclusión de *E. coli* Rosetta-gami.

Marcador de proteína pre-teñido (7-175 kDa): carril 1, sobrenadante del buffer de re-suspensión: carril 2, sobrenadantes de los buffers de lavado 1, 2 y 3: carril 3-5, extracto de cuerpos de inclusión: carril 6, precipitado final: carril 7.

El número de proteínas obtenidas en el extracto de cuerpos de inclusión en comparación con las proteínas totales disminuyó considerablemente. Esto lo podemos corroborar al contrastar el número de proteínas (o bandas) totales obtenidas

(**Figura 19**, sexto carril) con la cantidad de proteínas de cuerpos de inclusión obtenidas (**Figura 20**, sexto carril).

La purificación de hpENO como anteriormente se describió fue llevada a cabo por cromatografía de afinidad en columna de Niquel. En la **Figura 21** se aprecia los resultados de la purificación en columna empacada con resina Ni-NTA y el corte de la etiqueta de histidina. En el tercer carril de la **Figura 21** apreciamos la hpENO eluída de la columna de niquel.

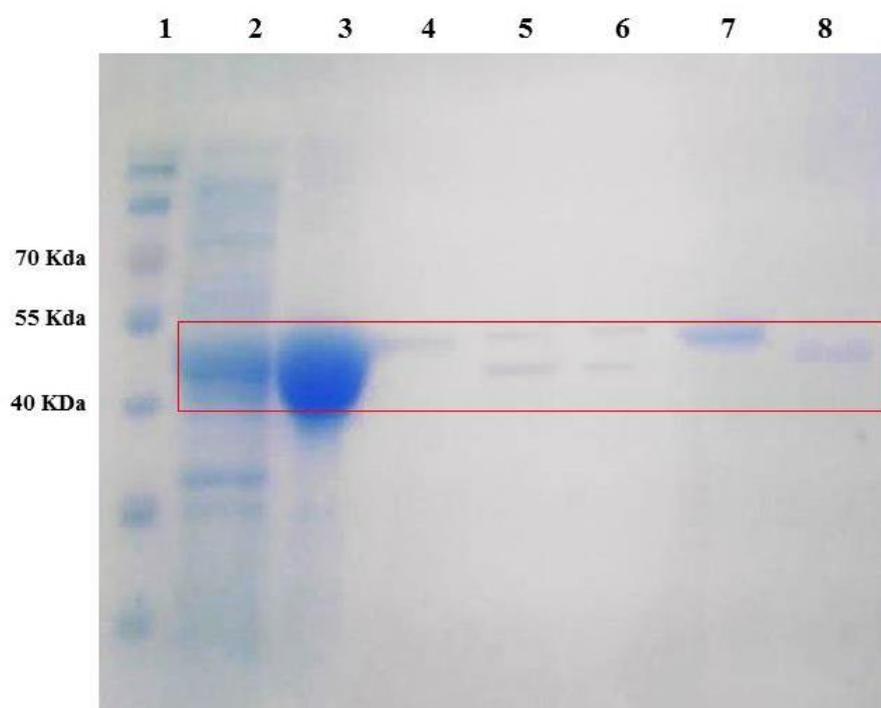


Figura 21. Purificación de hpENO por cromatografía de afinidad y corte de tracto de histidinas.

Marcador de proteína pre-teñido (7-175 kDa): carril 1, sobreexpresión estandarizada de hpENO: carril 2, extracto de cuerpos de inclusión: carril 3, hpENO purificada: carril 4, corte de hpENO a las 18 y 24 hr de incubación con PSP: carril 5-6, hpENO con tracto de histidina: carril 7, hpENO sin etiqueta de histidina: carril 8.

Inmediatamente después de la purificación de hpENO la etiqueta de histidina fue eliminada para evitar la agregación de la proteína. Para la separación de la etiqueta de histidinas se empleó la enzima preScission protease (PSP) previamente purificada. La PSP mostró una baja eficiencia de corte, aunque diferentes condiciones de corte fueron evaluadas nunca se apreció más del 50% de corte. En el

quinto y sexto carril de la **Figura 21** se observa que aun después de incrementar el tiempo de incubación de la hpENO no incrementa la eficiencia de corte de la PSP.

Finalmente después de una nueva separación cromatografía en columna de afinidad la enzima hpENO sin tracto de histidina fue obtenida en el flujo a través de la columna y concentrada (**Figura 21**, octavo carril), mientras que el resto de la hpENO con tracto de histidinas fue eluída de la columna (**Figura 21**, séptimo carril).

Con estas condiciones de purificación para la proteína recombinante hpENO, la pureza de la proteína aislada fue superior al 95%, y los rendimientos fueron aproximadamente de 4 a 5 mg por litro de cultivo.

7.4 Caracterización estructural de proteína recombinante hpENO

Se llevó a cabo el análisis de la estructura primaria, secundaria y terciaria de hpENO para detallar si esta proteína podría ser competente para desarrollar su actividad enzimática y/o otras funciones de pluriempleo, descritas anteriormente para otras enolasas.

7.4.1 Caracterización de estructura primaria

La traducción del gen de la enolasa de *H. pylori* da como resultado una proteína de 426 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 46.54 KDa. La proteína enolasa en el género *Helicobacter* es una proteína conservada, un alineamiento múltiple de 6 especies de este género muestra que comparten una identidad de secuencia superior al 64%. Mientras que el alineamiento de treinta y seis cepas de *H. pylori* mostro una identidad entre las cepas superior al 96%. En la **Figura 22** se presenta un gráfico de la identidad de la enolasa entre especies del género *Helicobacter* y entre cepas de *H. pylori*.

En el **Cuadro 22** se pueden apreciar los porcentajes de identidad de la proteína enolasa de *H. pylori* con la enolasa de diferentes organismos. En esta comparación de secuencias encontramos que la enolasa de *H. pylori* comparte el 44%, 52% y 59% de identidad con la enolasa de levadura, *E. coli* y *X. fastidiosa*, respectivamente.

Cuadro 22. Porcentaje de identidad y similitud entre enolasas.

<i>H. pylori</i>	<i>H. pylori</i>									
<i>H. cetorum</i>	87% 94%	<i>H. cetorum</i>								
<i>X. fastidiosa</i>	54% 71%	54% 72%	<i>X. fastidiosa</i>							
<i>S. pneumoniae</i>	51% 69%	52% 69%	59% 73%	<i>S. pneumoniae</i>						
<i>E. coli</i>	52% 71%	52% 70%	61% 75%	57% 71%	<i>E. coli</i>					
<i>E. histolytica</i>	47% 65%	46% 64%	48% 65%	49% 64%	48% 63%	<i>E. histolytica</i>				
<i>P. falciparum</i>	46% 64%	46% 64%	47% 66%	49% 66%	47% 64%	60% 72%	<i>P. falciparum</i>			
<i>T. brucei</i>	44% 63%	44% 63%	47% 63%	47% 64%	48% 63%	60% 73%	58% 71%	<i>T. brucei</i>		
<i>S. cerevisiae</i>	44% 63%	44% 62%	48% 67%	47% 66%	49% 67%	58% 72%	60% 74%	57% 72%	<i>S. cerevisiae</i>	
<i>H. sapiens</i>	44% 63%	45% 64%	48% 69%	46% 66%	50% 66%	61% 76%	66% 79%	57% 74%	62% 79%	<i>H. sapiens</i>

Cuadro elaborado a partir de alineamientos múltiples de secuencias. El porcentaje de identidad entre ambas secuencias se muestra en negritas en la parte superior de cada una de las celdas, el porcentaje de similitud se muestra en la parte inferior.

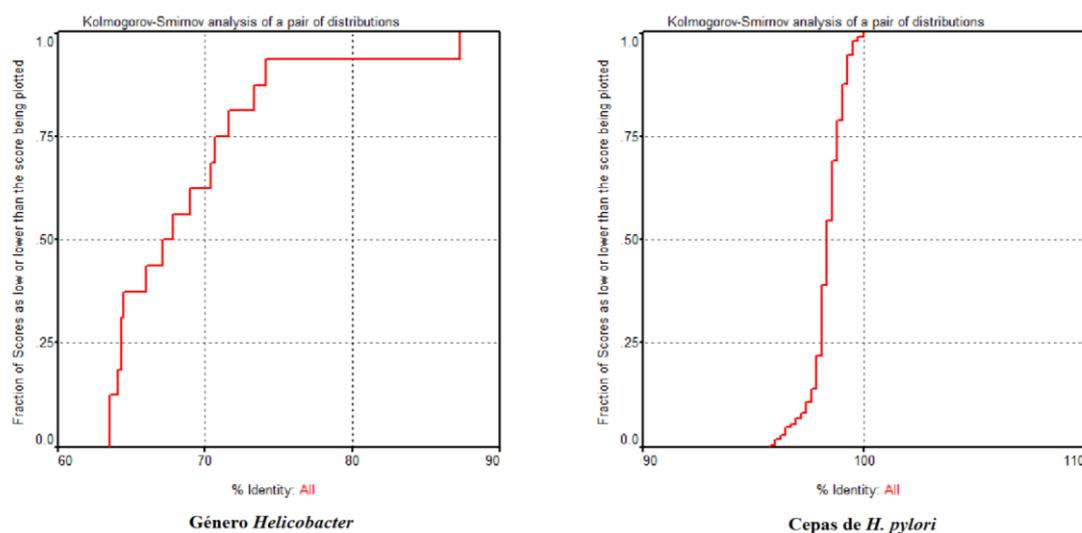


Figura 22. Porcentaje de identidad de enolasa en género *Helicobacter* y en cepas de *H. pylori*.

Izquierda: Porcentaje de identidad entre especies del genero *Helicobacter* (*H. pylori* 26695, *H. cinaedi* PAGU611, *H. bizzozeronii* CIII-1, *H. cetorum* MIT-00-7128, *H. felis* ATCC-49179, *H. canadensis* MIT-98-5491). **Derecha:** Porcentaje de identidad entre cepas de *H. pylori* (26695, 35A, F30, F16, F32, 52, F57, Shi112, Shi417, Puno135, Puno120, Cuz20, Shi169, Shi470, Sat464, v225d, HPAG1, HUP_B14, 2017, 908, 2018, B38, G27, Gambia94_24, J99, PeCan18, ELS37, SJM180, B8, P12, SouthAfrica7, Lithuania75, SNT49, PeCan4, 83,51).

7.4.1.1 Sitio de unión catalítica y de metal

Se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos UniProt, la cual recopila la información detalla de proteínas importantes, dado que el sitio catalítico de la enolasa de diferentes organismos ha sido descrito por múltiples estructuras de rayos X y de mutagénesis sitio-dirigida (Ehinger et al. 2004; Kang et al. 2008; Lebioda and Stec 1991), esta información ya está disponible en la base de datos de Uniprot para su análisis y comparación. En esta base de datos se describe el sitio catalítico de enolasa de diferentes especies; en general en él se describen siete residuos de amino ácidos para el sitio activo de la α -enolasa de humano (obtenidos experimentalmente); H¹⁵⁸, E¹⁶⁷, E²¹⁰, E²⁹³, D³¹⁸, K³⁴³, y K³⁹⁴; así mismo se detallan también los sitios catalíticos para la enolasa de *H. pylori* 26695 y de otros muchos organismos (inferidos por similitud de secuencia). Mediante el alineamiento múltiple de las secuencias de la enolasa de los diferentes organismos observamos que todos los residuos descritos para el sitio catalítico están conservados. La conservación de los residuos del sitio catalítico entre diferentes organismos se evidencia en el alineamiento de secuencias de enolasa mostrado en la **Figura 23**.

En cuanto a los sitios de unión a Mg^{2+} para la enolasa, la base de datos Uniprot, describe en general los mismos aminoácidos para la mayoría de los organismos analizados con excepción de la α -enolasa de humano. Para la α -enolasa de humano se describen cuatro sitios de unión a Mg^{2+} ; S⁴⁰, D²⁴⁵, E²⁹³ y D³¹⁸, mientras que para la enolasa de *H. pylori* 26695 y el resto de los organismos analizados son describen únicamente tres aminoácidos; D²⁴², E²⁸⁶ y D³¹³. Sin embargo, en el alineamiento múltiple realizado con las secuencias de la enolasa de estos organismos, los cuatro sitios de unión a Mg^{2+} reportados para la α -enolasa de humano se encuentran conservados en la enolasa de todas las especies analizadas incluyendo la enolasa *H pylori*.

Además de los aminoácidos de sitio catalítico y de unión a Mg^{2+} para la α -enolasa humana (hENO1), se han descrito tres bucles implicados también en la catálisis, L1³⁷SGASTGIY⁴⁴, L2¹⁵⁷SHAGNKLA¹⁶⁴ y L3²⁶³SPDDPSRYI²⁷¹ (Kang et al. 2008). En hpEno, L1 y L2 muestran las secuencias ligeramente conservadas, mientras que L3 no se conserva en absoluto (**Figura 23**).

7.4.1.2 Sitio de unión a plasminógeno

El sitio descrito para la unión a plasminogeno fue analizado también en la secuencia de la enolasa de los organismos analizados, este análisis *in silico* mostró que en *H. pylori*, el sitio podría estar compuesto por²⁴⁸LVDENFN-Y²⁵⁵, lo que implica que el sitio putativo de unión al plasminógeno de hpeno mantiene solo los residuos ácidos característicos, pero no los aminoácidos básicos que han sido descritos previamente.

7.4.1.3 Sitio de unión del ARN extracelular (exARN) del huésped

En cuanto a los sitios de unión a ARN extracelular reportados para la enolasa de *Streptococcus pneumoniae* (Zakrzewicz et al. 2016), varios de estos residuos de aminoácidos se conservan (principalmente en los extremos de estos motivos) en la secuencia de hpeno, a excepción del segundo motivo, que tiene dos residuos de lisina ausentes en la secuencia de hpeno (**Figura 23**).

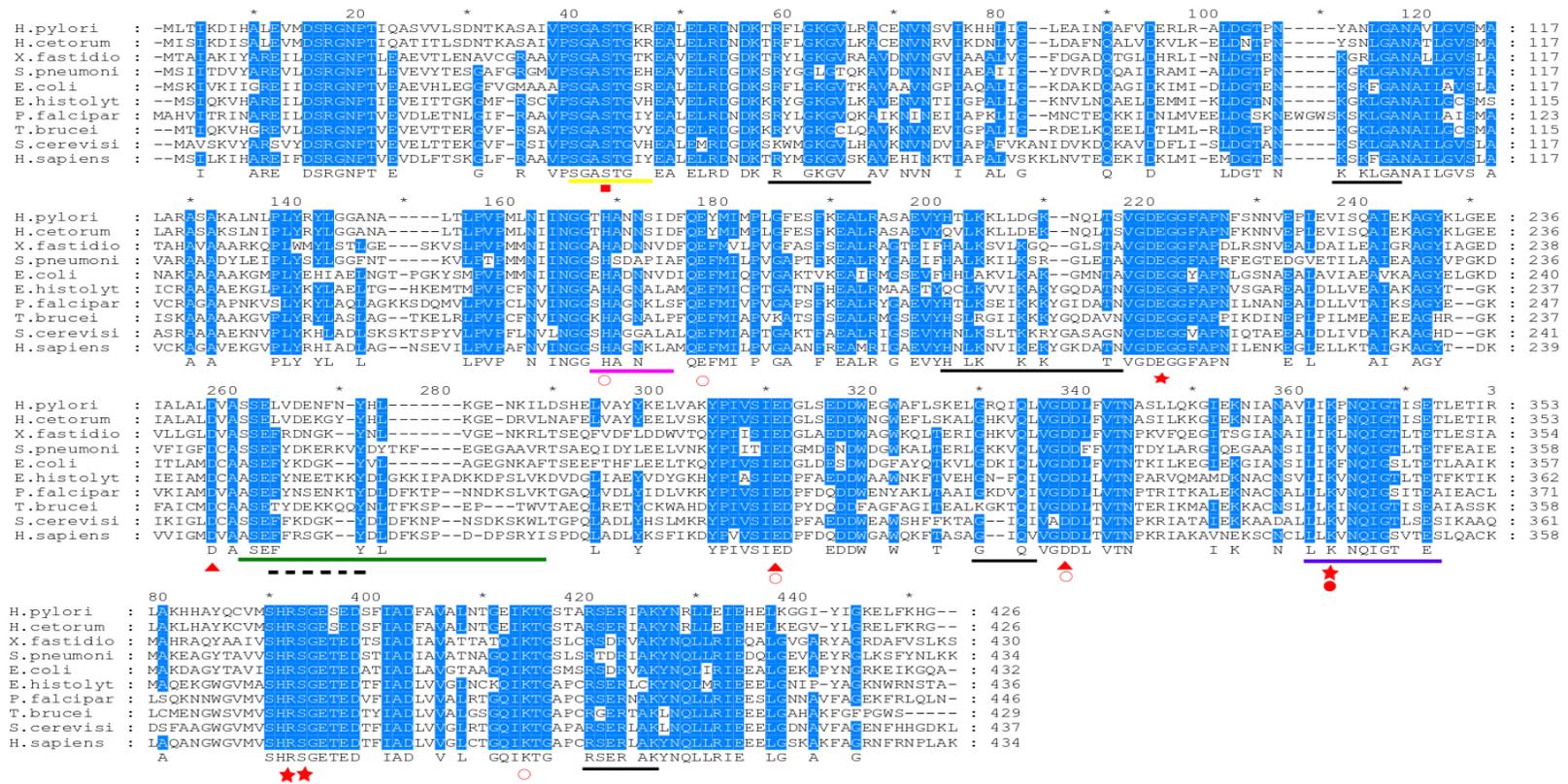


Figura 23. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de hpeno con homólogos de diferentes especies.

Las especies incluyen *H. pylori* 26695 (P48285), *H. cetorum* (I0ELQ0), *X. fastidiosa* (Q9PDT8), *S. pneumoniae* (Q97QS2), *E. coli* (P0A6P9) and *E. histolytica* (N9UZM6), *P. falciparum* (Q27727), *T. brucei* (Q38BV6), *S. cerevisiae* (P00924) y humano (α -enolasa, P06733). Sitio de unión de metal reportado solo para α -enolasa humana: rectángulo, sitio de unión de sustrato: círculo abierto, sitios activos: estrella, sitios de unión de metales: triángulo, sitio de unión de sustrato en forma inhibida: círculo cerrado, sitios para la unión de ARN: líneas negras, regiones para la unión del plasminógeno en *S. pneumoniae*: las líneas punteadas, bucle L1: línea amarilla, bucle L2: línea rosa, bucle L3: línea verde, firma de la enolasa: línea azul.

7.4.2 Caracterización de estructura secundaria y terciaria

Las estructuras secundaria y terciaria de la apo y holo-hpENO recombinante se analizaron mediante dicroísmo circular (CD) de UV lejano y espectroscopia de fluorescencia respectivamente. Incluso con las condiciones extremas de purificación la proteína enolasa mostro contenido de estructura secundaria y estructura terciaria.

La apo-hpENO y holo-hpENO presentaron estructura secundaria en las tres soluciones amortiguadoras valoradas: tris-HCl, tris-acetato y fosfato de potasio. En la **Figura 24** se muestran los espectros de dicroísmo circular obtenidos para la apo-hpENO nativa en las tres soluciones. En esta figura podemos apreciar algunas pequeñas variaciones en las lecturas de los espectros de dicroísmo circular entre las diferentes soluciones tampón valuadas. Estas tenues diferencias en los espectros de UV-DC podrían indicar sutiles modificaciones en la estructura secundaria de la apo-hpENO.

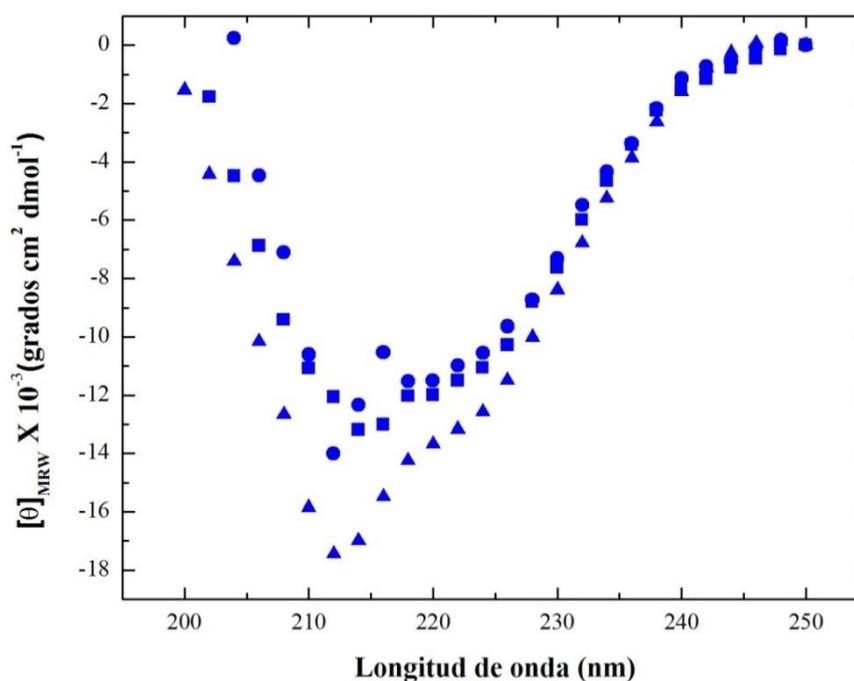


Figura 24. Espectros de DC en la región del UV lejano de apo-hpENO, obtenidos en tres soluciones amortiguadoras.

Tris-HCl: cuadrado; tris-acetatos; círculo y fosfatos de potasio: triángulo.

Se observan también pequeñas variaciones similares en la lectura de los espectros obtenidos cuando se agrega $MgCl_2$ en diferentes concentraciones a la

hpENO (holo-hpENO). En la **Figura 25** se presentan los espectros de UV-DC para la apo y holo-hpENO en la solución tampón de tris-HCl, en la **Figura 26** se muestran los espectros UV-DC para la apo y holo-hpENO en la solución tampón de tris-acetato y finalmente en la **Figura 27** se muestran los espectros UV-DC para la apo y holo-hpENO en la solución tampón de fosfato de potasio. Como se puede observar el comportamiento de la hpENO es similar en los tampón tris-HCl y tris-acetato. En las **Figuras 21, 22 y 23** se distingue que los espectros de la apo-hpENO en los tampones antes mencionados arrojan lecturas de θ_{MRW} inferiores a las de la holo-hpENO; en cambio los espectros de la apo-hpENO en la solución tampón de fosfatos presentan lecturas de θ_{MRW} superiores a los de la holo-hpENO.

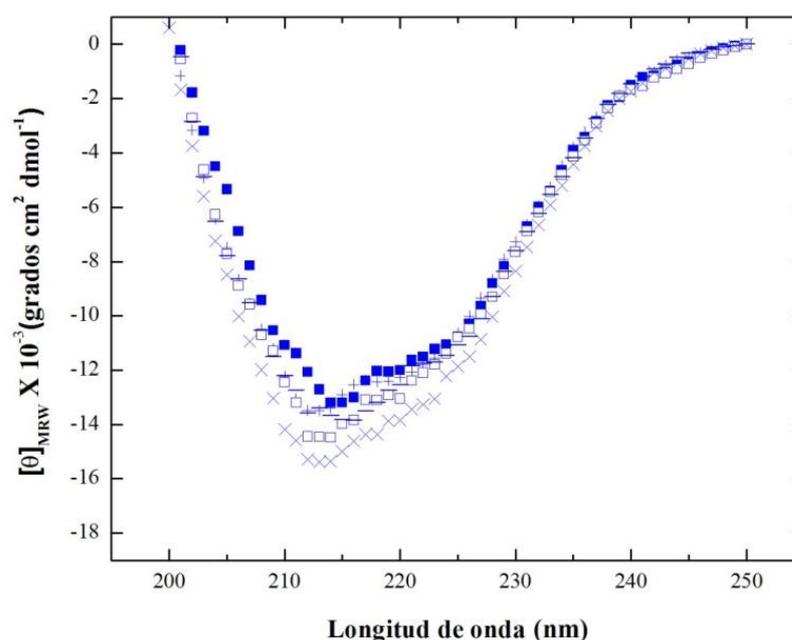


Figura 25. Estructura secundaria de apo y holo-hpENO en tris-HCl.

Apo-hpENO: cuadrado lleno, el resto de los símbolos corresponde a holo-hpENO, con la solución de proteína complementada con $MgCl_2$; 0.5 mM: cruz, 2 mM: cuadrado vacío; 4 mM: guión, 10 mM: letra X.

Para el análisis de la estructura terciaria, fue empleado como anteriormente se mencionó un espectrofluorómetro. Los espectros de fluorescencia de la apo-hpENO como la holo-hpENO concuerdan con las características de una proteína plegada (con estructura terciaria), en las tres soluciones amortiguadoras valoradas: tris-HCl, tris-acetato y fosfato de potasio. En la **Figura 28** se muestran los espectros de intensidad de fluorescencia obtenidos para la apo-hpENO nativa en las tres soluciones tampones evaluados. Los espectros de fluorescencia de la apo-hpENO coinciden en la posición

de longitud de onda, no se observa desplazamiento del centro espectral de masas. La diferencia de intensidades de fluorescencia entre los tampones analizadas es un efecto conocido como “quenching” o atenuación de la fluorescencia y no tiene nada que ver con la exposición de los residuos aromáticos o la pérdida de estructura terciaria de la proteína.

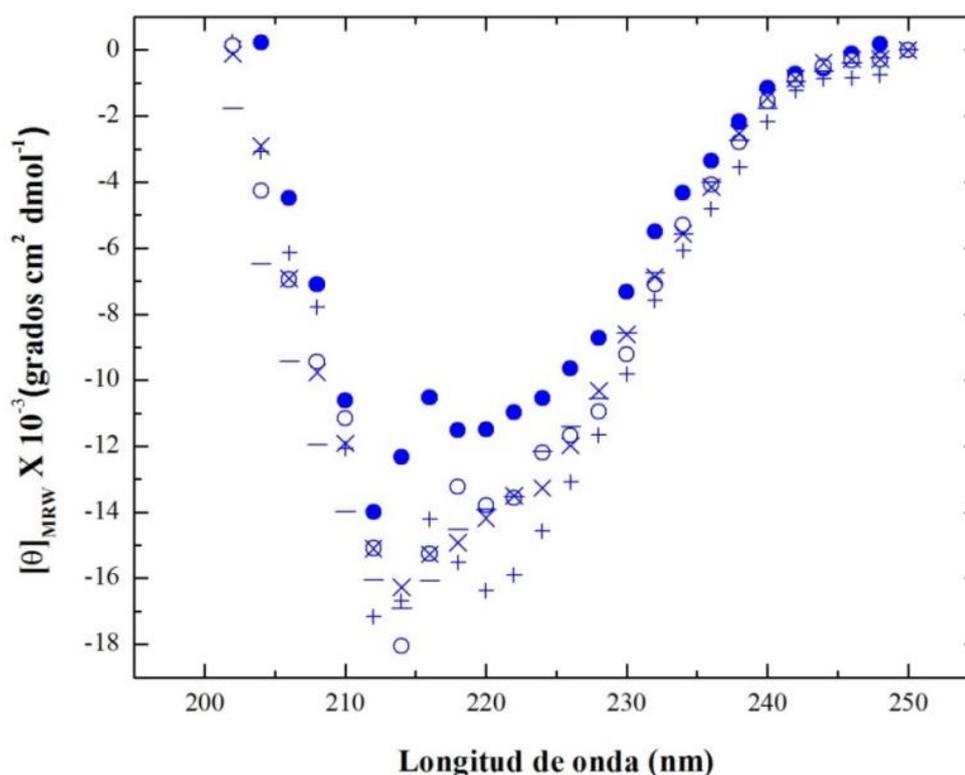


Figura 26. Estructura secundaria de apo y holo-hpENO en tris-acetato.

Apo-hpENO: círculo lleno, el resto de los símbolos corresponden a holo-hpENO, con la solución de proteína complementada con $MgCl_2$; 0.5 mM: cruz, 2 mM: círculo vacío, 4 mM: guión, 10 mM: letra X.

En la **Figura 29** se presentan los espectros de fluorescencia para la apo y holo-hpENO en la solución tampón de tris-HCl, en la **Figura 30** se muestran los espectros fluorescencia para la apo y holo-hpENO en la solución tampón de tris-acetato y finalmente en la **Figura 31** se muestran los espectros fluorescencia para la apo y holo-hpENO en la solución tampón de fosfato de potasio. En las **Figuras 25, 26 y 27** se observa que los espectros de la apo-hpENO en los tampones antes mencionados proporcionan lecturas de intensidad de fluorescencia superiores a las de

la holo-hpENO. Es por ello que en general podemos decir que el comportamiento de la hpENO es idéntico en los tres tampones evaluados.

Sin embargo, a pesar de la disminución en la intensidad de fluorescencia de la holo-hpENO no se observa un cambio significativo en el centro espectral de masas por lo que no podemos hablar de un cambio en la posición de los aminoácidos aromáticos de la hpENO, es decir no se evidencia cambios en la estructura terciaria de la proteína. En la **Figura 32** se muestra el centro espectral de masa obtenidos para la apo y holo-hpENO con diferentes concentraciones de Mg^{2+} en los tres tampones evaluados.

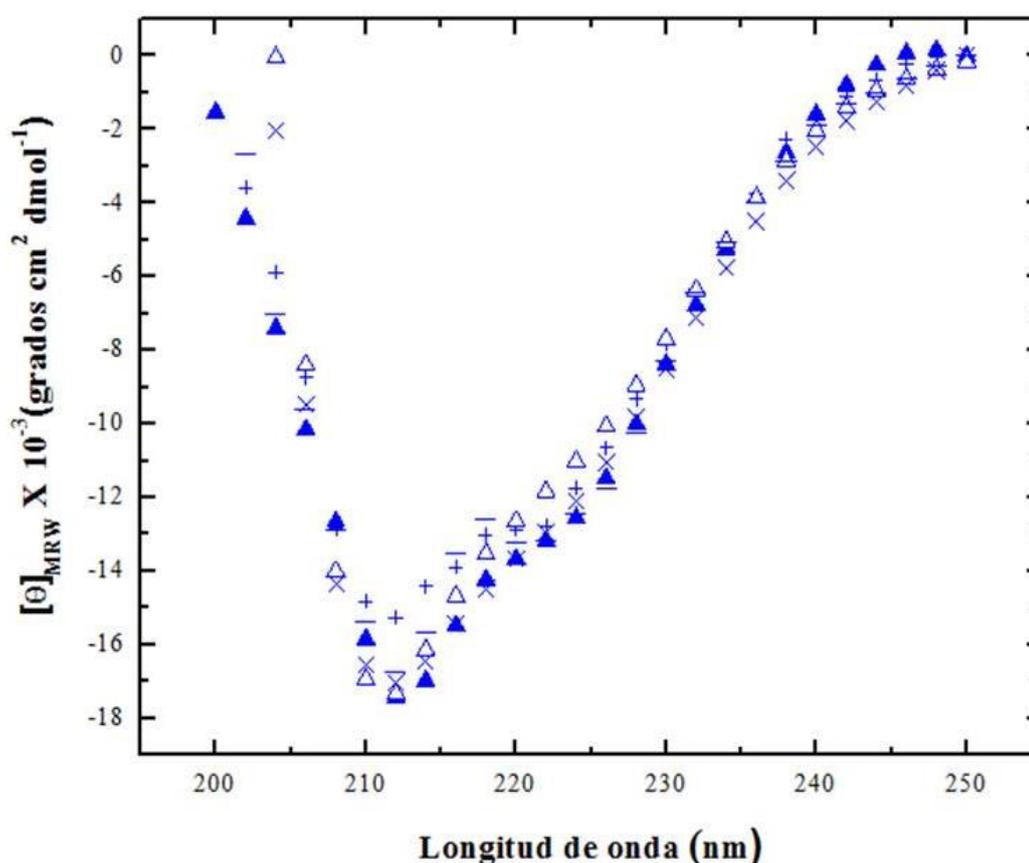


Figura 27. Estructura secundaria de apo y holo-hpENO en fosfatos de potasio.

Apo-hpENO: triángulo lleno, el resto de los símbolos corresponde a holo-hpENO, con la solución de proteína complementada con $MgCl_2$; 0.5 mM: cruz, 2 mM: triángulo vacío, 4 mM: guión, 10 mM: letra X.

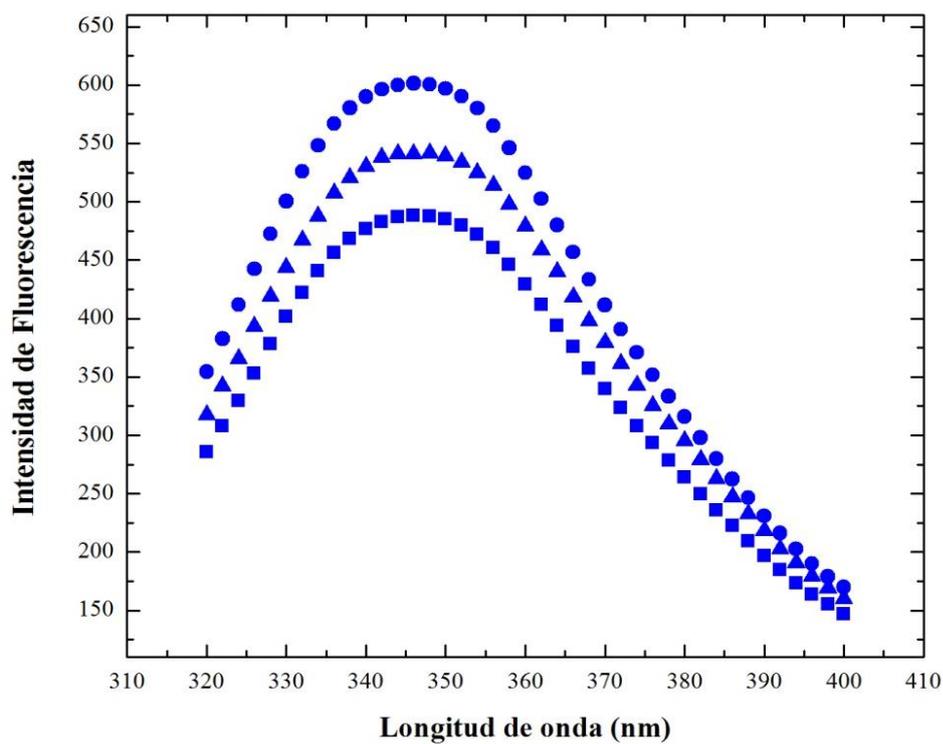


Figura 28. Emisión de fluorescencia de apo-hpENO, obtenidos en tres soluciones amortiguadoras.

Longitud de onda de excitación de 280 nm. tris-HCl: cuadrado, tris-acetatos: círculo, fosfato de potasio: triángulo.

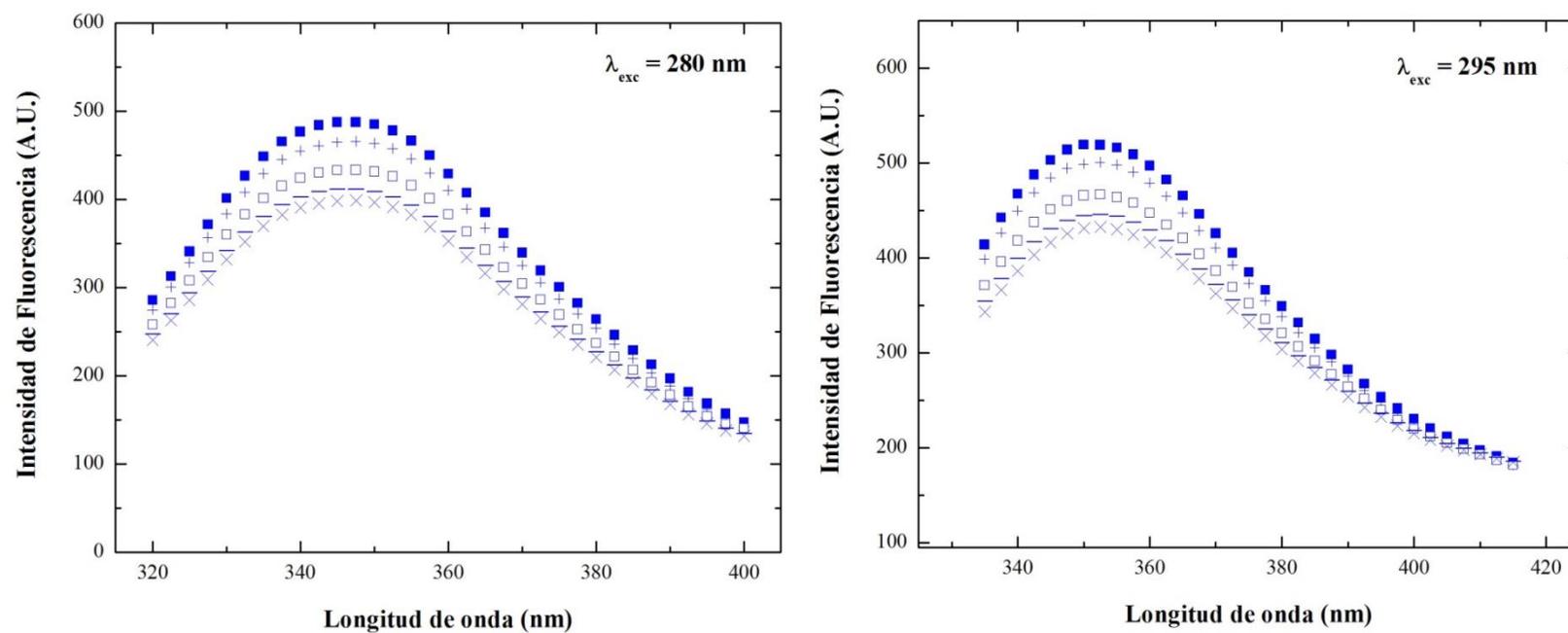


Figura 29. Emisión de fluorescencia de apo y holo-hpENO en tris-HCl.

Izquierda: Emisión de fluorescencia a 280 nm. Derecha: Emisión de fluorescencia a 295 nm. Apo-hpENO: cuadrado lleno, el resto de los símbolos corresponde a holo-hpENO, con la solución de proteína complementada con MgSO₄; 0.5 mM: cruz, 2 mM: cuadrado vacío, 4 mM: guión, 10 mM: letra X.

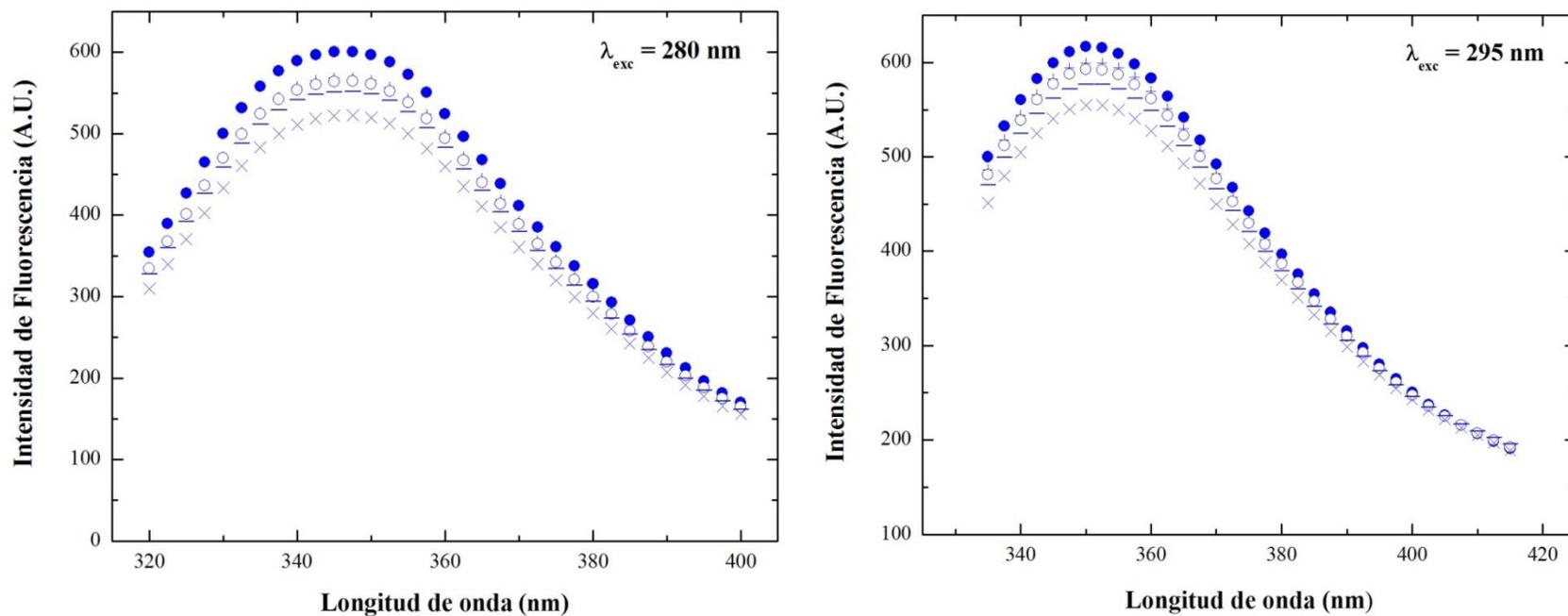


Figura 30. Estructura terciaria de apo and holo-hpENO en tris-acetato.

Izquierda: Emisión de fluorescencia a 280 nm. Derecha: Emisión de fluorescencia a 295 nm. Apo-hpENO: círculo lleno, el resto de los símbolos corresponde a holo-hpENO, con la solución de proteína complementada con MgSO_4 ; 0.5 mM: cruz, 2 mM: círculo vacío, 4 mM: guión, 10 mM: letra X.

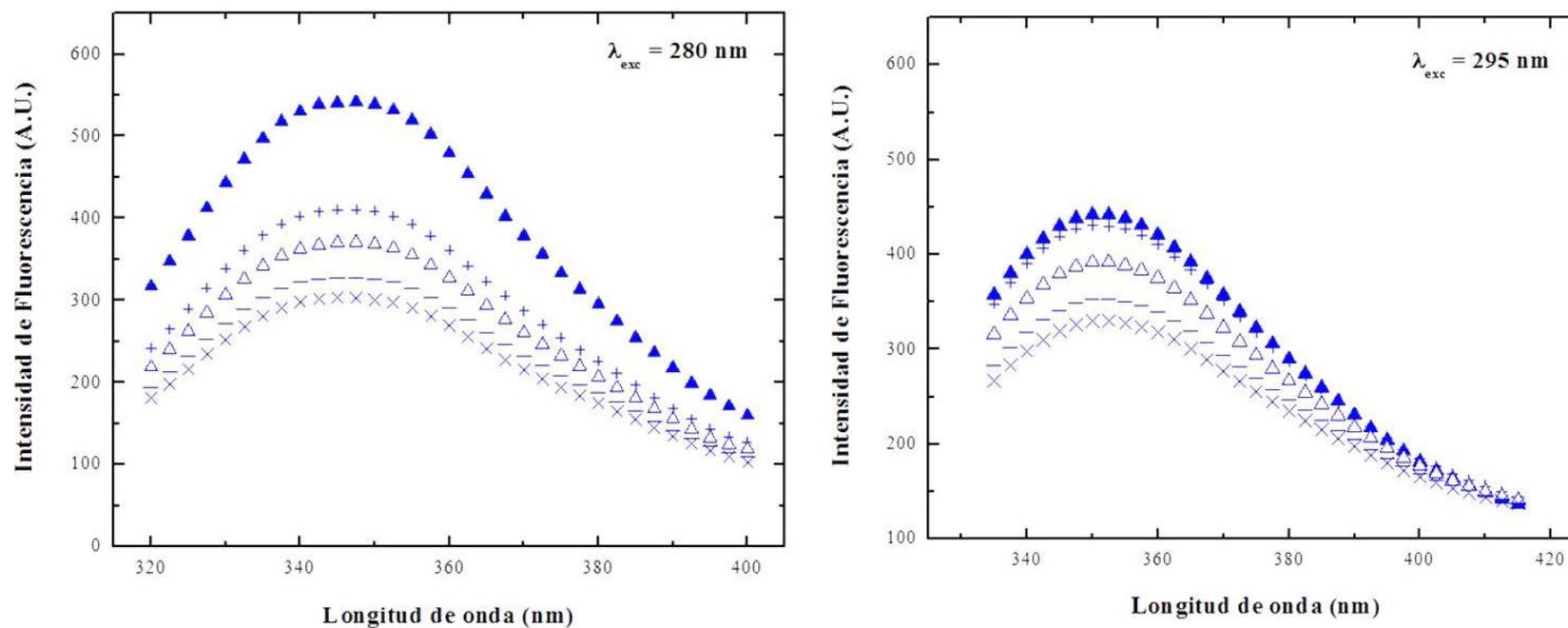


Figura 31. Estructura terciaria de apo and holo-hpENO en fosfato de potasio.

Izquierda: Emisión de fluorescencia a 280 nm. Derecha: Emisión de fluorescencia a 295 nm. Apo-hpENO: triángulo lleno, el resto de los símbolos corresponde a holo-hpENO, con la solución de proteína complementada con MgSO_4 ; 0.5 mM: cruz, 2 mM: triángulo vacío, 4 mM: guión, 10 mM: letra X.

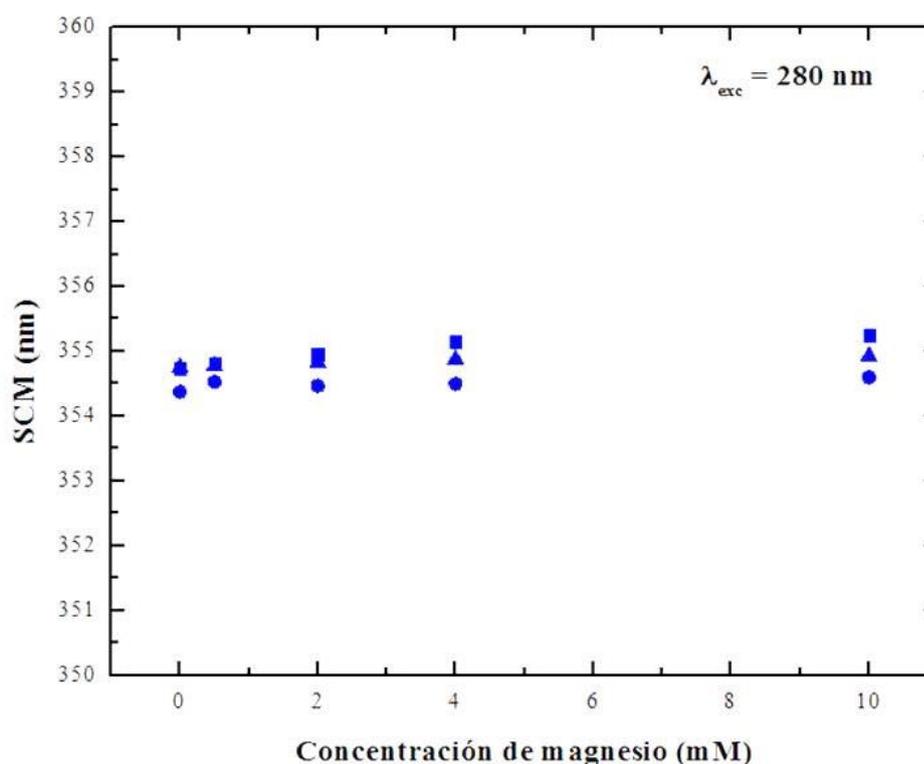


Figura 32. Centro espectral de masas de espectros de fluorescencia de apo-hpENO y holo-hpENO.

Espectros de fluorescencia tomados con una longitud de onda de excitación de 280 nm. Tris-HCl: cuadrado, tris-acetatos: círculo, fosfato de potasio: triángulo.

7.4.3 Modelo de estructura de enolasa de *H. pylori*

El modelo para la enolasa de *H. pylori* fue obtenido por homología con el programa en línea swiss-model. En la **Figura 33** se presenta en modelo de hpENO. La estructura secundaria obtenida en el modelo para la hpENO cumple con las características de armadura típica de otras proteínas enolasa. En la figura también se ilustran los aminoácidos aromáticos que contribuyen al espectro de fluorescencia de la proteína. En la secuencia de aminoácidos de hpENO encontramos solo dos residuos de triptófano en cada subunidad (W294 y W297), de los cuales uno de ellos (W294) se encuentra completamente expuesto en la conformación de la proteína, lo que puede explicar el desplazamiento a la derecha del espectro de emisión de fluorescencia.

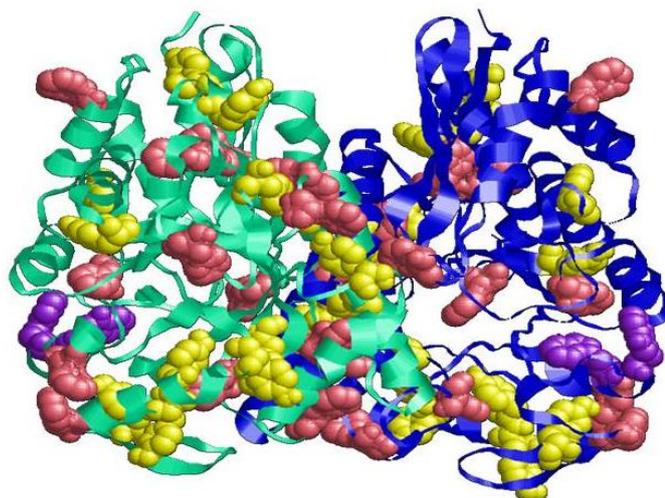


Figura 33. Modelo de estructura de enolasa de *H. pylori* por homología.

Listón cian: cadena A, listón azul: cadena B, morado: triptófano, rosa: fenilalanina, amarillo: Tirosina.

7.5 Estabilidad térmica de hpENO

La estabilidad térmica de apo- y holo-HpEno se examinó a partir de la desnaturalización inducida de la proteína (pérdida de estructura secundaria) por un incremento gradual en la temperatura. En la **Figura 34** Figura 34. Perfiles de desplegamiento térmico de apo y holo-hpENO, en tres soluciones amortiguadoras se muestran los perfiles de desnaturalización de hpENO en los tres tampones evaluados. Los perfiles de des-plegamiento de algunas condiciones de la apo- y holo-hpENO no pudieron ser monitorizados hasta su terminación, ya que las temperaturas de desplegamiento de estas fueron incluso superiores a la temperatura máxima que se puede alcanzar con el accesorio Peltier del equipo de dicróismo circular. Por lo tanto, los perfiles obtenidos en estas condiciones experimentales no permiten obtener parámetros termodinámicos precisos asociados a la desnaturalización térmica de la proteína recombinante. Otra característica importante es el efecto del Mg^{2+} en la estabilidad térmica. Como se observa en la **Figura 34** la estabilidad termica de la holo-hpENO es perturbada por el ambiente químico. En los tampones de tris-HCl y tris-acetatos el Mg^{2+} parece tener un efecto desestabilizador en la holo-hpENO, conforme aumenta la concentración del cofactor, la holo-hpENO pierde estabilidad térmica. Por el contrario en el tampón de fosfatos de potasio el cofactor, ayuda a aumentar la estabilidad térmica de la holo-hpENO.

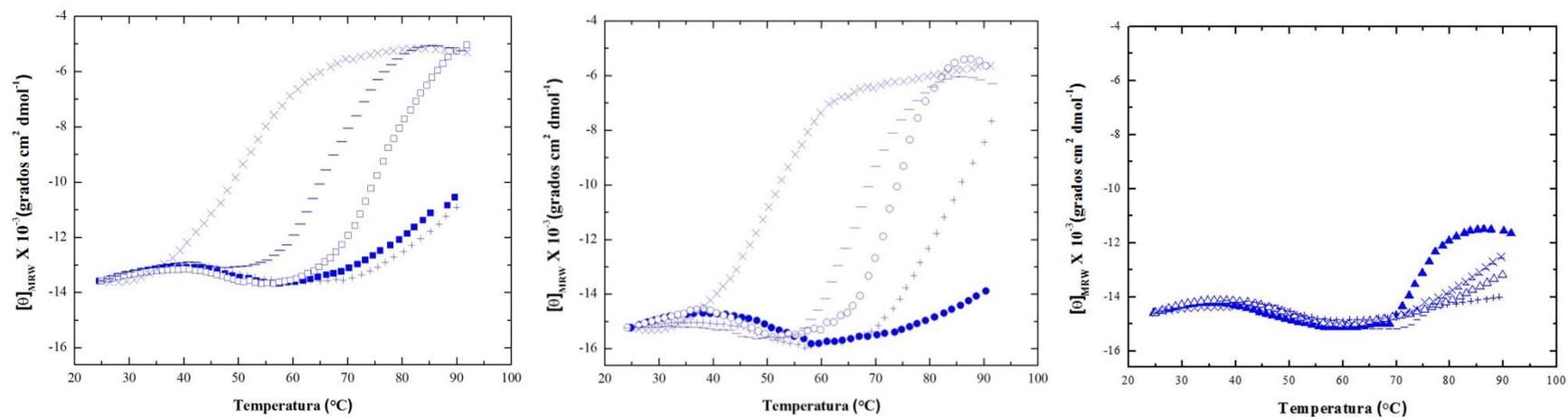


Figura 34. Perfiles de desplegamiento térmico de apo y holo-hpENO, en tres soluciones amortiguadoras.

Izquierda: tris-HCl. Centro: tris-acetatos. Derecha: fosfato de potasio. Apo-hpENO: cuadrado, círculo y triángulo relleno, el resto de los símbolos corresponde a holo-hpENO, con la solución de proteína complementada con $MgCl_2$; 0.5 mM: cruz, 2 mM: cuadrado, círculo y triángulo vacío, 4 mM: guión, 10 mM: letra X.

En el **Cuadro 23** se resumen las temperaturas del punto medio de desnaturalización térmica (T_m) de la apo y holo-hpENO en los tres tampones evaluados. Con base a los datos recaudados podemos decir que la hpENO es térmicamente más estable en el tampón de fosfato de potasio.

Cuadro 23. Temperaturas del punto medio de desnaturalización térmica (T_m) para hpENO.

Proteína	Tris-HCl	Tris-acetatos	Fosfato de potasio
apo-hpENO	> 90 °C	> 90 °C	73 °C
holo-hpENO (MgSO ₄ 0.5 mM)	> 90 °C	> 90 °C	> 90 °C
holo-hpENO (MgSO ₄ 2 mM)	78 °C	74 °C	> 90 °C
holo-hpENO (MgSO ₄ 4 mM)	68 °C	65 °C	> 90 °C
holo-hpENO (MgSO ₄ 10 mM)	54 °C	50 °C	> 90 °C

Durante los estudios de desplegamiento térmico se estudiaron también los espectros de la apo y holo-hpENO durante tres instantes del desplegamiento térmico; el primero se tomó antes de iniciar el desplegamiento (espectro de proteína nativa), el segundo se obtuvo una vez alcanzada la temperatura máxima de 90 °C (espectro de proteína desnaturalizada térmicamente), y finalmente el tercero se consiguió después de permitir el decremento gradual de la temperatura (espectro de proteína enfriada). Los espectros obtenidos de este modo de la apo y holo-hpENO se muestran en la **Figura 35**. Los espectros muestran que en tris-HCl y tris-acetatos, tanto la apo-hpENO como la holo-hpENO fueron incapaces de recuperar completamente la estructura secundaria nativa después del desplegamiento térmico. En cambio en el tampón de fosfato de potasio tanto la apo como la holo-hpENO fueron capaces de recuperar su estructura nativa previa al desplegamiento térmico.

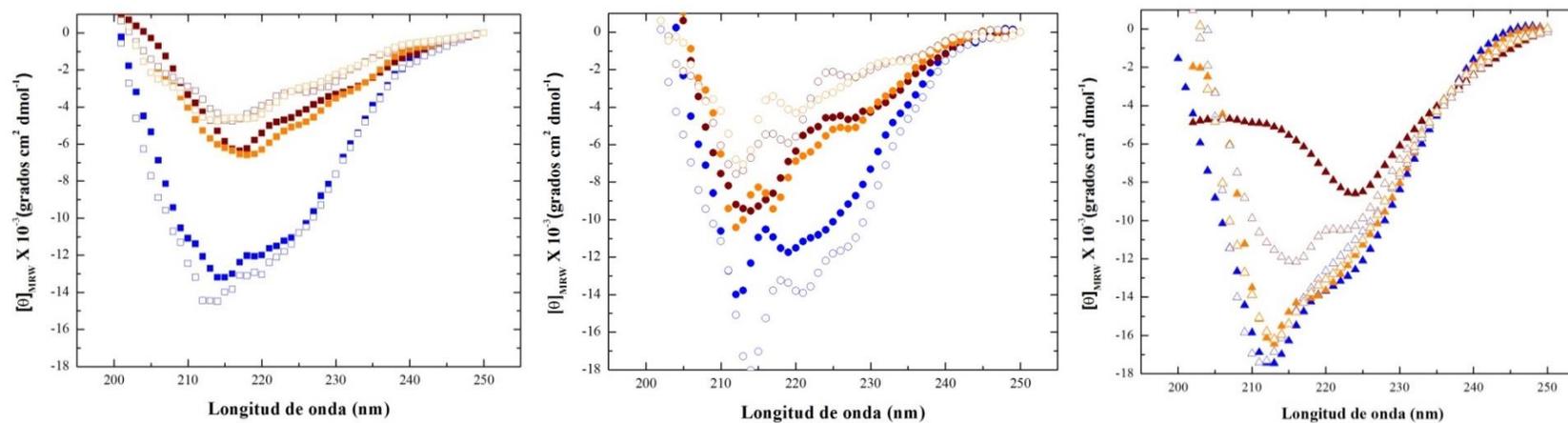


Figura 35. Recuperación de la estructura secundaria de apo y holo-hpENO después del des-plegamiento térmico.

Izquierda: tris-HCl. Centro: tris-acetatos. Derecha: fosfatos de potasio. Apo-hpENO: figuras con relleno, holo-hpENO con 2mM MgCl_2 : figuras sin relleno. Proteína nativa: azul, desplegada térmicamente (90 °C): guinda, fría: naranja.

7.6 Cinéticas de des-plegamiento

Dado que muchas en muchas de las condiciones la apo y holo-hpENO no completo su desplegamiento térmico, únicamente fue posible seguir la cinética de la holo-hpENO (4 mM de $MgCl_2$). La cinética de la reacción de desplegamiento inducida por temperatura de la holo-hpENO (4 mM de $MgCl_2$) en el tampón tris-HCl se siguió a 220 nm en el CD de UV lejano en cinco temperaturas que coinciden con los perfiles de desplegamiento térmico de la proteína en estas condiciones experimentales.

En la **Figura 36**, se muestran algunas curvas de desplegamiento obtenidas para la holo-hpENO en diferentes temperaturas. En estas imágenes podemos observar el efecto del tiempo en el desplegamiento de la proteína. Como es de esperarse, los cambios de estructura secundaria ocurren en menor tiempo, conforme aumenta la temperatura del experimento. Cada una de las curvas de cinéticas muestran perfiles de disminución de exponencial único, por lo tanto, se ajustaron utilizando ecuaciones de decaimiento exponencial y a partir de estos datos se calculó la constante de velocidad de reacción (k) para cada temperatura. Posteriormente las constantes de velocidad obtenidas para cada curva se emplearon para construir la gráfica de Eyring (**Figura 37**). Como podemos apreciar en el gráfico los puntos tienen un buen ajuste a la línea recta. En el análisis de regresión lineal el valor de r^2 obtenido en el ajuste fue de 0.99153.

Como anteriormente se mencionó la apo-hpENO es más estable térmicamente en el tampón de tris-HCl. Debido a ello no fue posible estudiar las cinéticas de desplegamiento de la apo-hpENO, ya que su alta estabilidad térmica hace es muy difícil controlar (o en su caso alcanzar la T_m) en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio.

7.7 Entalpía de activación (ΔH^\ddagger)

A partir de la pendiente de esta gráfica, se calculó la entalpía de activación (ΔH^\ddagger) asociada al desplegamiento térmico de la holo-hpENO (**Cuadro 24**). En la misma tabla también se muestra el correspondiente ΔH^\ddagger reportado para la holo-enolasa de levadura (Moreno-Vargas et al. 2011).

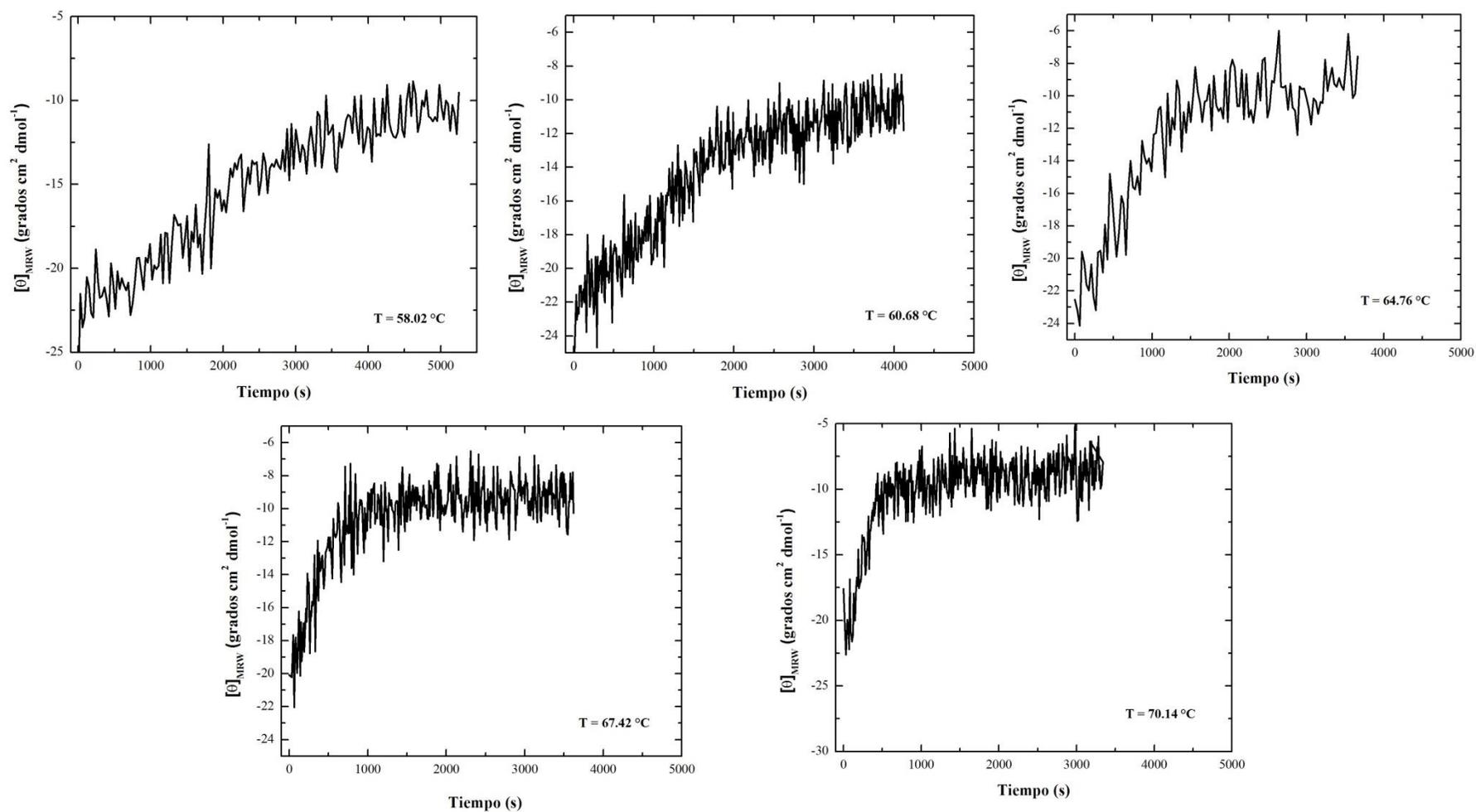


Figura 36. Cinéticas de des-plegamiento de holo-hpENO.

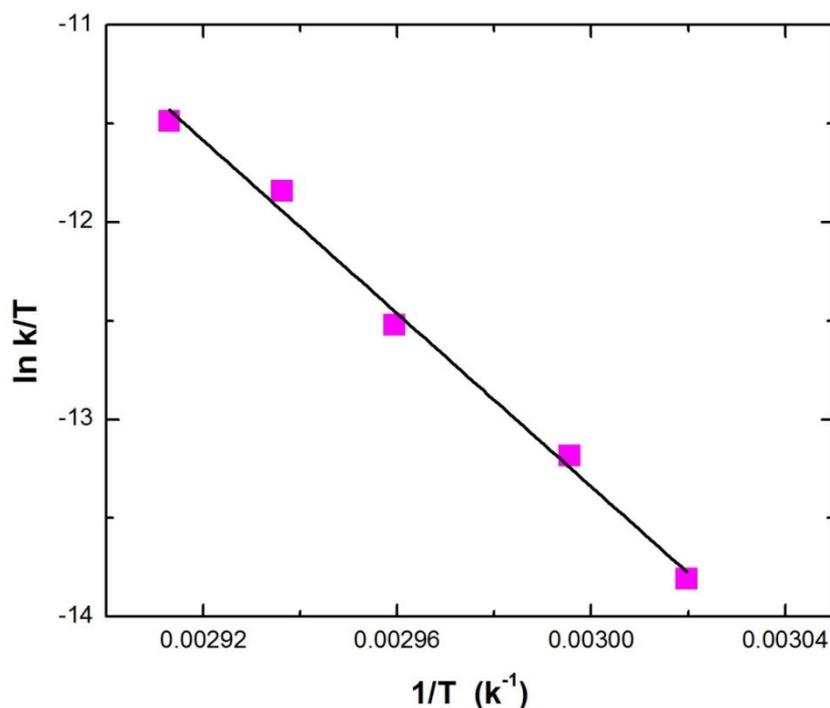


Figura 37. Gráfico de Eyring.

Cuadro 24. Entalpia de activación característica de enolasa

Organismo	Condición	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)
<i>H. pylori</i>	+ Mg ²⁺	179 (8)
Levadura (Moreno-Vargas <i>et al.</i> 2011)	+ Mg ²⁺	190 (30)

7.8 Actividad catalítica de hpENO

La actividad enzimática de la enolasa de *H. pylori* recombinante (hpENO) se evaluó siguiendo el protocolo estándar, sin embargo, no se pudo detectar la conversión del sustrato 2-PGA en PEP. Debido a los resultados desfavorables se exploraron una variedad de condiciones experimentales, algunas de ellas previamente reportadas para la actividad de enolasa de otras especies. Asimismo, se evaluaron otros parámetros como; concentración de hpENO o y sin etiqueta de histidinas (400 a 1800 ng ml⁻¹), temperatura de reacción, tiempo de monitoreo, solución de tampón y la concentración de reactivos.

A grandes rasgos entre las modificaciones evaluadas podemos mencionar las siguientes, ambiente químico del tampón (trietanolamina / HCl, tris-HCl, tris-acetato

y HEPES). Además, la concentración de cada reactivo se varió de la siguiente manera: 2-PGA (1,9 mM -125 mM), ADP (1,3 mM -2,5 mM), β -NADH (0,12-0,52), MgSO_4 (0,05-25 mM), KCl (18.8-100 mM), PYK de 7 a 23 U y LDH de 10 a 33 U.

El extracto de los cuerpos de inclusión (previo a purificación de la hpENO) también fue usado en ensayos. Sin embargo, todos estos intentos fueron infructuosos, ya que no se logró detectar la conversión de sustrato. Es importante mencionar que el control positivo (ScENO) mostró actividad enzimática en una gran variedad de condiciones, mostrando que los enzimas auxiliares y demás reactivos no eran factor limitante de la reacción catalítica.

En la **Figura 38** se muestran algunos de los resultados de seguimiento de la reacción catalítica de la enolasa recombinante de *H. pylori*.

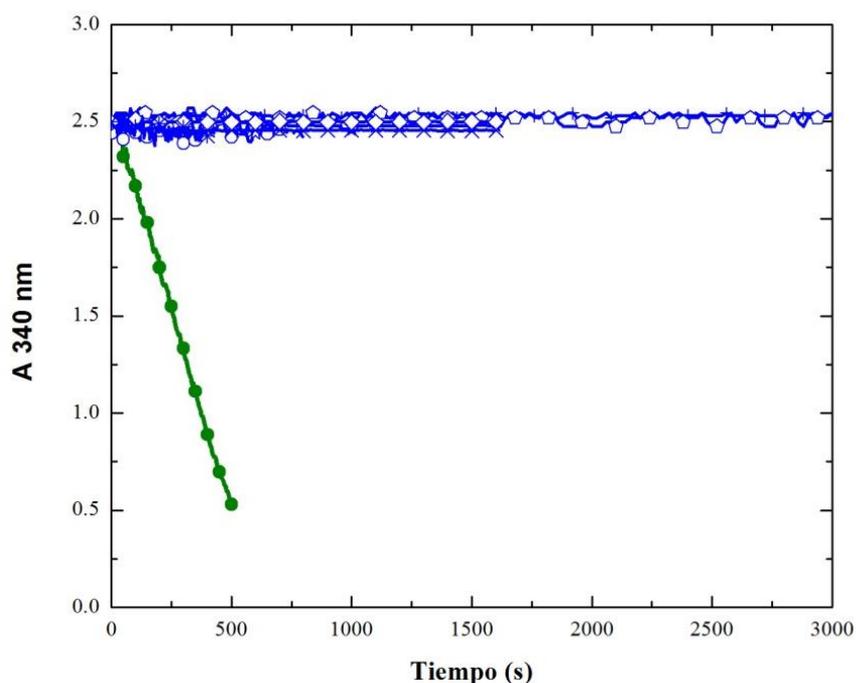


Figura 38. Determinación de actividad catalítica de hpENO

Círculo con relleno verde: ScENO en tampón TEA con 25mM de MgSO_4 , círculo sin relleno azul: hpENO en tris-acetatos con 5 mM de MgSO_4 , estrella sin relleno azul: hpENO en tampón TEA con 5 mM MgSO_4 , línea vertical azul: hpENO en tampón HEPES con 0.5 mM de MgSO_4 , pentágono sin relleno azul: hpENO en tampón TEA con 0.5 mM de MgSO_4 , cruz azul: hpENO con etiqueta de histidina en tampón TEA con 25 mM de MgSO_4 , rombo sin relleno azul: Extracto crudo de cuerpos de inclusión en tampón TEA con 5 mM de MgSO_4 , asterisco azul: hpENO en tampón TEA Buffer con 25 mM de MgSO_4 .

7.9 Sitios blancos de enolasa de *H. pylori*

Con el análisis de la estructura de aminoácidos de la enolasa realizado se identificaron alrededor de 30 zonas presentes únicamente en *H. pylori*, y no conservadas en la enolasa de otras especies biológicas, dichas zonas fueron comparadas con los 25 sitios con potencial para blanco sugeridos por MOE. Finalmente se seleccionaron cuatro sitios blancos donde existen aminoácidos presentes únicamente en la enolasa de *H. pylori*, lo cual hace más probable encontrar interacciones específicas entre la proteína y los compuestos con potencial farmacológico en el docking molecular. En la **Figura 39** se muestran los sitios-blanco propuestos para esta enzima.

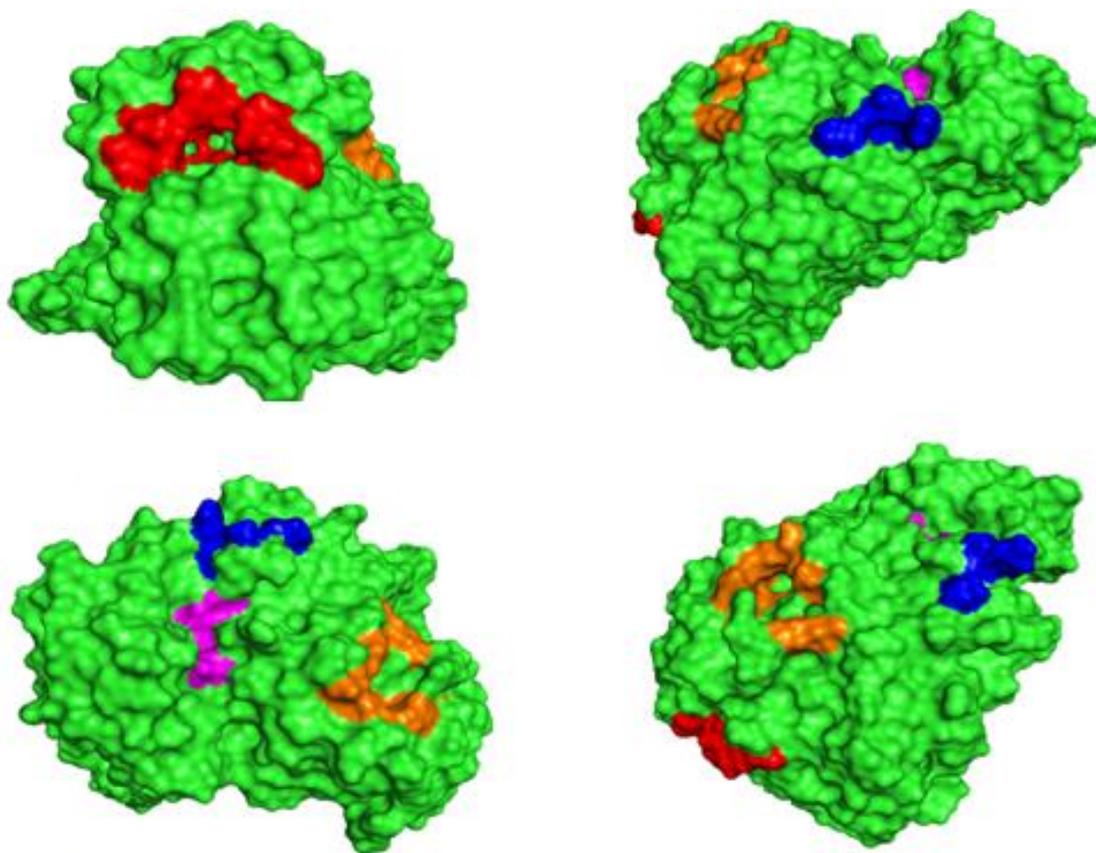


Figura 39. Sitios-blanco de enolasa de *H. pylori*.

Sitio 1: Rojo; sitio 2: azul; sitio 3: rosa y sitio 4: naranja

En el **Cuadro 25** se muestran los aminoácidos que conforma a los cuatro sitios blanco propuestos para la enolasa de *H. pylori*

Cuadro 25. Sitios blanco seleccionados para enolasa de *H. pylori*

Sitio	Residuos	Total de aminoácidos	Aminoácidos únicos en <i>H. pylori</i>
1	PHE162 ASN214 ASN215 VAL216 LEU257 GLU260 LYS262 LEU264 LEU269 TYR272 TYR273 GLU275 LEU276 LYS279	14	8
2	LEU128 PRO129 TYR131 ARG132 ALA137 ALA139 LEU140 GLU411 LEU412	9	4
3	ILE85 ASN86 GLN87 ALA88 PHE89 LEU134 ILE345 SER346 LEU349	9	3
4	SER301 GLY305 ARG306 LEU310 GLY326 ILE327 ASN330 ILE331 ALA332 ASN333 HIS358 ALA359 TYR360 LYS424	14	9

8. DISCUSIÓN

8.1 Obtención de la proteína recombinante enolasa de *H. pylori*

La proteína recombinante hpENO se sobreexpresó utilizando la cepa de *E. coli* Rosetta-gami; sin embargo, en todas las condiciones analizadas, la proteína recombinante se obtuvo siempre en la fracción insoluble (cuerpos de inclusión). A pesar de la ocurrencia frecuente de los cuerpos de inclusión, aun no se conoce en su totalidad el mecanismo responsable de su formación (Bowden and Georgiou 1990), sin embargo, diversos parámetros fisicoquímicos y fisiológicos se han correlacionado con la probabilidad de obtención de las proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión. Es generalmente aceptado que los procesos de agregación están favorecidos por; altas temperaturas de crecimiento de las células, concentraciones elevadas de proteína, síntesis anormal de la proteína, la falta de interacción con proteínas chaperonas, el nivel de expresión de la proteína, la concentración de co-solutos en el entorno de plegamiento (Bowden and Georgiou 1990; Schein and Noteborn 1988). También se ha demostrado que el uso de codones regula el plegamiento de proteínas, ya que el uso de codones preferidos aumenta la velocidad de elongación de la traducción, mientras que los codones no óptimos ralentizan la elongación y conducen a la agregación de proteínas en los cuerpos de inclusión. (Yu et al. 2015). Así también, la agregación de una proteína se ha relacionado fuertemente con las propiedades intrínsecas de su secuencia de aminoácidos (Ramon et al. 2014).

Durante la expresión de la enolasa recombinante de *H. pylori* esperábamos favorecer la producción de la proteína en la fracción soluble mediante el empleo de la cepa Rosetta-gami que con sus plásmidos de mRNAs de codones raros incrementa el porcentaje de codones preferidos y hace más efectivo el plegamiento adecuado de la proteína. Sin embargo, debido a la incapacidad de obtener a hpENO en la fracción soluble, los cuerpos de inclusión fueron solubilizados en urea 8M. En la literatura existen solamente dos informes de otros organismos en donde se reporta que la purificación de la enolasa a partir de cuerpos de inclusión, en ambos informes utilizan técnicas similares para la solubilización de estas proteínas (Facincani et al. 2003; Sharma et al. 2006). La urea es considerado el extractor de cuerpos de

inclusión más eficiente, sin embargo la enolasa de *Xylella fastidiosa*, la de músculo y la de hígado de pollo fueron desnaturalizados irreversiblemente por la urea, esto sugiere que este agente caotrópico no debería utilizarse para extraer la enolasa de los cuerpos de inclusión (Facincani et al. 2003); no obstante para la enolasa de levadura purificada con un protocolo similar, se obtuvo entre el 85-90% de reversibilidad de la reacción de desplegamiento inducida por urea (Sanchez-Miguel et al. 2010). Para hpENO el porcentaje de reversibilidad de la reacción de despliegue fue muy similar al de la enolasa de levadura.

Subsiguientemente a la obtención de la hpENO de los cuerpos de inclusión la proteína fue purificada por cromatografía de afinidad en columnas empacadas de níquel. La eficiencia de purificación en columna empacada es baja en comparación con las columnas pre-empacadas comerciales (HisTrap HP histidine-tagged protein purification columns, GE Healthcare), sin embargo, debido al gran volumen del extracto de cuerpos de inclusión obtenido el empleo de estas últimas era poco práctico e ineficiente. No obstante, una de las ventajas de la obtención de las proteínas en cuerpos de inclusión radica en una mayor eficacia del procedimiento de purificación ya que se reduce el porcentaje de unión no específica de otras proteínas.

Un factor importante para el correcto análisis de una proteína recombinante es lograr tener a la proteína en su forma más natural posible, por lo que la eliminación de las etiquetas añadidas a su secuencia es primordial (Waugh 2011). Además, durante la purificación de la hpENO observamos que la presencia de la etiqueta de histidinas contribuyó a la rápida agregación de la proteína, es por ellos que inmediatamente después de la purificación de hpENO la etiqueta de histidina fue eliminada. En nuestro laboratorio, la enzima PSP es empleada para eliminar la etiqueta de histidinas de varias proteínas recombinantes, observándose en la mayoría de los casos un 100% de eficiencia de corte, no obstante, para la hpENO fue imposible superar el 50% de eficiencia de corte; este problema de ineficiencia de corte se presentó también con la enolasa recombinante de otras especies (humano y *Trichomonas vaginalis*). Además del problema de eficiencia de corte también se presentaron problemas en el proceso de separación de hpENO con y sin etiqueta de histidina; por lo que fue necesario adicionar nuevamente 8M urea para la disociación del dímero y la separación de proteínas sin etiqueta de histidina (**Figura 21**). Nuestra teoría para explicar este problema radica en la predilección de la enolasa por la

formación de estructuras cuaternarias (dímeros u octámeros) y la coincidencia del sitio de interacción entre las subunidades con el sitio de corte del tracto de histidinas. A pesar de las complicaciones técnicas la hpENO se purificó exitosamente y aunque su eficiencia de purificación fue baja (4-5 mg de hpENO por litro de cultivo), la calidad de la proteína purificada fue buena (no se observó co-purificación de otra proteína).

8.2 Caracterización estructural de proteína recombinante hpENO

La estructura secundaria de la hpENO fue analizada por medio de difracción circular en la región del UV-lejano. Los espectros de DC-UV lejano obtenidos manifiestan que la estructura de la hpENO en diferentes ambientes químicos (tampones) permanece casi inalterable. Los pequeños cambios obtenidos en los espectros de la hpENO en los diferentes tampones pueden estar relacionados con la re-estructuración de los residuos expuestos de la proteína debido al ambiente químico, así como por la concentración de su cofactor Mg^{2+} . Algunos autores han reportado espectros para la enolasa de otras especies similares (Karbassi et al. 2010; Pal-Bhowmick et al. 2007). Por ejemplo, los cambios en los espectros de DC de enolasa de levadura y de *Plasmodium falciparum*, fueron relacionados con el cambio del estado oligomérico de las enzimas originado por alteraciones en el ambiente químico (imidazol) (Pal-Bhowmick et al. 2007).

Los espectros de DC de la hpENO fueron comparados con los espectros de enolasa de otros organismos. Está claro que los espectros de DC de UV-lejano de la apo y holo-HpEno obtenidos en diferentes condiciones de tampón son casi superponibles entre ellos, además, se asemejan a los espectros reportados para otros ortólogos, lo que implica que el contenido de la estructura secundaria es comparable a la estructura de la enolasa de otras especies. En la **Figura 40** podemos apreciar los espectros de DC de UV-lejano reportados para la enolasa de distintas especies en comparación con los obtenidos para hpENO, como se puede apreciar en la figura el espectro de la enolasa de *H. pylori* es muy similar a los espectros previamente reportados para la enolasa de otras especies (Cork et al. 2009; Karbassi et al. 2010). Así mismo en la **Figura 40** se puede observar que los espectros de emisión de fluorescencia de la apo y holo-hpENO se desplazan hacia la derecha en comparación con los otros espectros de emisión, lo que indica los residuos de triptófano de la hpENO tienen una mayor exposición al disolvente, en comparación con las enzimas

de *P. falciparum* y *S. cerevisiae*, estos datos coinciden con el modelo por homología obtenido para la hpENO.

Los espectros de emisión de fluorescencia no muestran efecto del tampón sobre la estructura terciaria de la apo y holo-hpENO. Al igual que los espectros de DC, los espectros de emisión de fluorescencia de la apo y holo-hpENO fueron similares a los espectros de enolasa de otras especies (**Figura 40**). La disminución de la intensidad de emisión que podemos percibir en los espectros, han sido también reportados previamente para la enolasa de levadura y *P. falciparum*, estos resultados se asocian también a la estructura cuaternaria de la enolasa (estado oligomérico de la enzima) (Pal-Bhowmick et al. 2006). Este efecto es conocido como “quenching” o atenuación de fluorescencia, es cualquier proceso que disminuye la intensidad de fluorescencia de un determinado fluoróforo sin cambiar su emisión, es decir no es debido a un cambio estructural de la proteína si no a una pérdida en la intensidad de fluorescencia. Por lo que podemos afirmar que no hay cambios en la estructura terciaria de la enolasa, esto lo confirma la preservación del centro espectral de masas de la enzima (**Figura 32**).

Fue posible también la identificación de cuatros sitios en la superficie de la hpENO con capacidad de unión de compuestos con potencial farmaceutico. Estos sitios poseen varios aminoácidos únicos en la secuencia de la enolasa de *H. pylori*, lo que implicaría la inhibición selectiva de esta enzima.

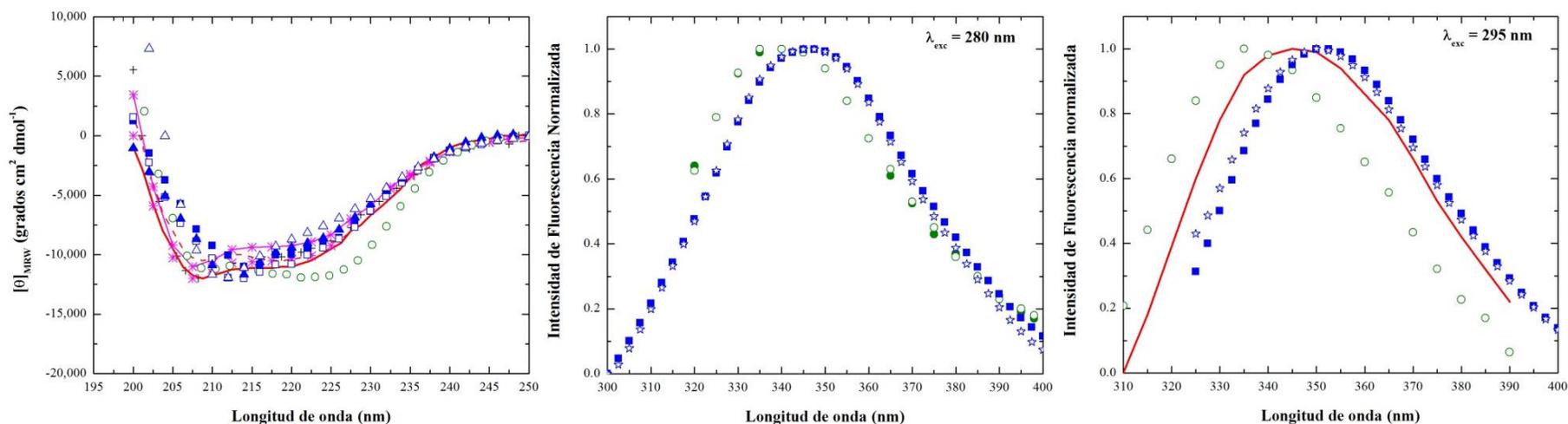


Figura 40. Equiparación de estructura secundaria y terciaria de enolasa.

Izquierda: Espectros de dicroísmo circular de UV lejano. Enolasa de la superficie celular de estreptococo: Cruz negra, enolasa de *P. falciparum* (dímero): línea roja, enolasa (monómero) de *P. falciparum*: línea discontinua roja, enolasa de *S. Pyogenes* (tampón TME): línea rosa con asteriscos, enolase de *S. pyogenes* (tampón de glicina): asterisco rosa, enolasa de *S. cerevisiae*: círculo verde, apo-hpENO (tampón tris-HCl): cuadrado azul relleno, holo-hpENO (tampón tris-HCl): cuadrado azul sin relleno, apo-hpENO (tampón fosfato de potasio): triángulo azul relleno, holo-hpENO (tampón fosfato de potasio): triángulo azul sin relleno.

Centro: Espectros de emisión de fluorescencia para la longitud de onda de excitación de 280 nm. Enolasa *S. cerevisiae* (tampón tris-acetato): círculo verde relleno, *S. cerevisiae* enolasa (tampón tris-HCl): círculo verde sin relleno, apo-hpENO (tampón tris-HCl): cuadrado azul relleno, apo-hpENO (tampón tris-acetato): estrella azul.

Derecha: Espectros de emisión de fluorescencia para la longitud de onda de excitación de 295 nm. Enolasa de *P. falciparum*: línea roja, enolasa de *S. cerevisiae* (tampón tris-HCl): círculo verde sin relleno, apo-hpENO (tampón tris-HCl): cuadrado azul relleno, apo-hpENO (tampón tris-acetato): estrella azul.

8.3 Estabilidad térmica de hpENO y entalpía de activación (ΔH^\ddagger)

Las transiciones de desnaturalización térmica de la apo- y holo-hpENO monitoreadas en DC de UV-lejano, muestran en general perfiles de des-plegamiento que inician a temperaturas muy altas (alrededor de 70 y 75 °C) y en algunos casos el desplegamiento de la proteína no se completa, incluso a 90 °C (la temperatura máxima del equipo). Al comparar los perfiles de desnaturalización térmica de la hpENO con los de la enolasa de levadura, podemos decir que en general la hpENO mantiene su estructura a temperaturas más altas que la enolasa de levadura (**Figura 41**).

La estabilidad térmica no se puede establecer únicamente a partir de las temperaturas de pérdida de estructura, ya que se deben tener en cuenta varias consideraciones, como la reversibilidad del desplegamiento y el mecanismo de desnaturalización. La alta estabilidad de hpENO implica que la proteína recombinante tiene una red bien establecida de contactos intramoleculares. Es importante señalar que el Mg^{2+} tiene un efecto desestabilizador en el caso de hpENO, similar a la enolasa de *Plasmodium falciparum* (Vora et al. 2009), mientras que la característica común es que los cofactores estabilizan la enolasa al igual que muchas otras enzimas (Rodrigues et al. 2012).

A partir de los datos obtenidos en el desplegamiento térmico se tomaron temperaturas cercanas a la T_m para seguir la cinética de la reacción de desnaturalización térmica para holo-hpENO, del análisis de la cinética de reacción se determinó la entalpía de activación asociada al proceso de desplegamiento de la holo-hpENO. De forma interesante, este valor es equivalente al de la enolasa levadura (**Cuadro 24**). Dado que la entalpía de activación no se calcula a partir del valor absoluto de las constantes de velocidad de desnaturalización, sino de su dependencia de la temperatura, esto significa que dos proteínas con diferentes estabilidades de conformación pueden mostrar entalpías de activación asociadas al desplegamiento térmico similares (Moreno-Vargas et al. 2011). Además, estos valores sugieren que, aunque las proteínas provienen de organismos distantes y sus secuencias no tienen un índice de conservación alto, su mecanismo de plegamiento/desplegamiento podría estar conservado a juzgar por los valores casi idénticos.

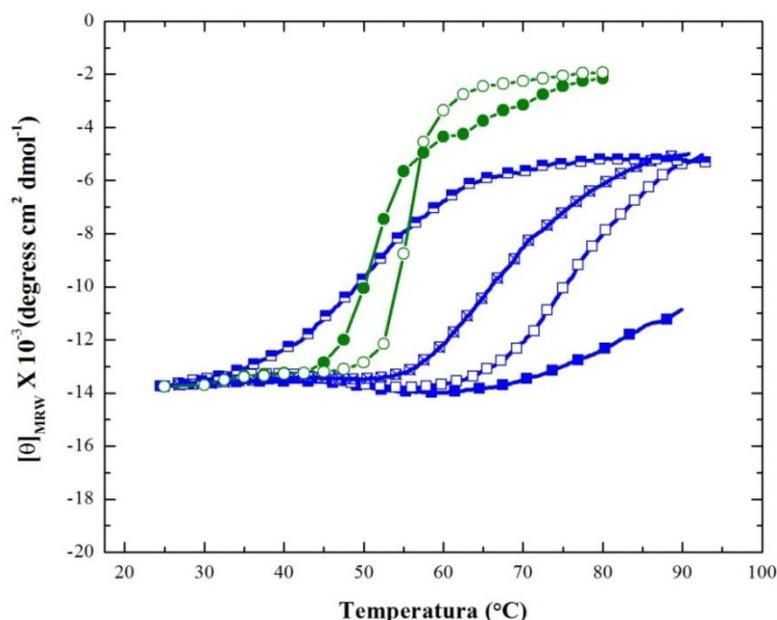


Figura 41. Despliegamiento térmico de enolasa de *H. pylori* y *S. cerevisiae*.

hpENO: identificadores en color azul; apo-hpENO: cuadrado relleno, el resto corresponden a holo-hpENO suplementada con MgCl_2 : 2 mM: cuadrado vacío, 4 mM: cuadrado con letra X, 10 mM: cuadrado medio relleno. scENO: identificadores en color verde; apo-scENO: círculo relleno, holo-scENO: círculo sin relleno.

8.4 Actividad catalítica de hpENO

Para la estimación de la actividad enzimática de hpENO fueron evaluadas diversas condiciones experimentales, sin embargo, en ninguna de ellas fue posible la detención de actividad catalítica de la enzima. Se pueden proponer varias explicaciones plausibles para este resultado.

La explicación más fundamental es la estructura primaria de la proteína, es decir que la proteína no tenga en su secuencia los aminoácidos esenciales para llevar a cabo la función catalítica (aminoácidos implicados: en la unión del sustrato, unión del cofactor, aceptor y donador de protón). Sin embargo, esta posibilidad quedó completamente descartada en el análisis de secuencia de la hpENO y en el alineamiento múltiple con la proteína enolasa de otros organismos. Estos estudios confirmaron la alta conservación de la enzima enolasa de *H. pylori*, y su similitud aún con especies divergentes, deducciones similares fueron previamente reportadas (Jones and Holt 2007; Pal-Bhowmick et al. 2004). Esto revela que la nula actividad

enzimática de la hpENO no puede ser ocasionada por una secuencia incompleta de aminoácidos implicados en la función catalítica de la enzima.

Otro factor determinante en la actividad de las enzimas es el plegamiento no apropiado de la proteína recombinante (estructura secundaria y terciaria). Como se indicó anteriormente, las evidencias experimentales obtenidas a través de los espectros de DC de UV-lejano, los espectros de fluorescencia y el valor de la entalpía de activación asociada a la desnaturalización de la holo-hpENO, expusieron que la estructura secundaria, terciaria y los parámetros bioquímicos de la hpENO son comparables con los reportados para la enolasa de otras especies, por lo que podemos establecer que la nula actividad enzimática de la hpENO podría no estar asociada a su conformación (Moreno-Vargas et al. 2011).

Se verificaron todos los genomas de *H. pylori* secuenciados y depositados en la base de datos del NCBI, todos ellos los contienen el gen de enolasa, lo que indica que este gen debería tener un papel importante en los procesos metabólicos celulares, pero podría no ser para la glucólisis. En el genoma de *H. pylori* 26695, existe la mayoría de los genes enzimáticos de la vía de la glucólisis, excepto tres genes, *pyk*, piruvato quinasa, la enzima correspondiente al último paso para la formación de piruvato en la glucólisis; *pfk*, fosfofructoquinasa y *gnd*, 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Además, la actividad de la fosfoglicerato mutasa (*pgm*) no se ha detectado, la enzima que cataliza en el paso anterior a la etapa de enolasa en la glucólisis (Marais et al. 1999). Así, en la cepa 26695, la reacción catalizada por enolasa podría no ser necesaria en la producción de piruvato. En comparación con más de 100 genomas de *H. pylori* secuenciados, también puede obtener el resultado similar. El gen *pyk* existe en algunas cepas de *H. pylori* pero no así los genes, *pfk* y *gnd*. Por otro lado, se reportado previamente que la oxidación de la glucosa es viable a través de la vía de Entner-Doudoroff (Chalk et al. 1994), la existencia de la vía de Entner-Doudoroff ha sido completamente confirmada en *H. pylori* mediante análisis genómico (Wanken et al. 2003). Por lo tanto, se puede concluir que la vía Entner-Doudoroff como la única forma de producir desde la glucosa hasta el piruvato es una característica común de *H. pylori*.

Lo anterior podría sugerir que ya que la enolasa no es necesaria para la ruta de la glucólisis, tal vez esta no se produzca, sin embargo dado la omnipresencia de la enzima en todos los genomas secuenciados y el genoma reducido de esta bacteria

esto no sería energéticamente viable para el organismo. Además tenemos evidencia de que la proteína hpENO es producida por la bacteria, esta proteína se expresó y se verificó su presencia en los productos desplegables en un ensayo donde la proteína MreB fue empleada como cebo en el lisado celular de *H. pylori* 26695 en una investigación de nuestro laboratorio (Zepeda Gurrola et al. 2017).

Teniendo en cuenta la enolasa expresada en *H. pylori* y su falta de actividad enzimática, todavía queda una pregunta importante. ¿Cuál sería la función de esta proteína dentro de este organismo? La enolasa es una proteína cuya multifuncionalidad han sido bien establecida en varios organismos (Pancholi 2001). Particularmente en organismos procarióticos, donde se ha encontrado en la superficie celular interactuando con plasminógeno, como es el caso para *Streptococcus pneumoniae* (Bergmann et al. 2001). Para este mismo organismo, se ha descrito también recientemente la unión de la enolasa a exRNA del huésped (Zakrzewicz et al. 2016). Ambas funciones no catalíticas de la enolasa se han propuesto como posible factor de virulencia de este patógeno. El análisis de secuencia de hpENO indicó también la presencia de un sitio de plasminógeno parcialmente conservado, ya que se conservan solo los residuos ácidos característicos, pero no los aminoácidos básicos descritos para *S. pneumoniae* (Bergmann et al. 2003), por lo tanto, si hpENO es capaz de unirse al plasminógeno sigue siendo incierto. Otra probabilidad es que la hpENO pueda unirse a exRNAs del huésped, esto lo suponemos con base en la presencia de varios residuos conservados en el sitio de unión putativo en hpENO. Por lo tanto, aunque todavía tiene que ser analizado y confirmado experimentalmente, existe la posibilidad de que hpENO interactúe con el exRNA derivado del huésped, contribuyendo así a facilitar la colonización y la diseminación de bacterias (Zakrzewicz et al. 2016).

9. CONCLUSIONES

El análisis de la secuencia de la proteína enolasa de *H.pylori* mostró una identidad de secuencia superior al 96% entre cepas de esta misma especie, mientras que con las enolasas de levadura, *E. coli* y *X. fastidiosa* la hpENO comparte el 44%, 52% y 59% de identidad respectivamente. Esta misma comparación de secuencias evidenció que la hpENO conserva todos los sitios activos y aminoácidos requeridos para la actividad catalítica de la enzima. Este alto porcentaje de conservación de la secuencia y de sitios activos aun en especies de filos lejanos insinúa que el gen debería tener una función importante en las células.

La enolasa de *H. pylori* se clonó exitosamente, así mismo se desarrolló un sistema de sobreexpresión y purificación para la obtención de la proteína recombinante hpENO en su estado más puro posible. Los parámetros fisicoquímicos medidos para la proteína expresada (masa molecular y coeficiente de absorción a 280 nm) concuerdan con los parámetros pronosticados (a partir de la secuencia de aminoácidos) en las base de datos disponibles.

La estructura secundaria y terciaria de la hpENO fue caracterizada a partir de los espectros de DC de UV-lejano y de emisión de fluorescencia. La hpENO expuso contenido de estructura secundaria y terciaria aún inclusive con las condiciones extremas de purificación. Las características estructurales expuestas por la hpENO fueron similares a las de sus homólogos en otras especies, sin embargo, la hpENO también mostró algunas características distintivas en aspectos de estabilidad térmica y de interacción con el cofactor Mg^{2+} . Los espectros de DC de UV-lejano y de estabilidad térmica de la hpENO expusieron una pérdida de estructura secundaria y de estabilidad térmica originada por una alta concentración de su cofactor Mg^{2+} .

La entalpía de activación determinada para la holo-hpENO fue equivalente a la reportada para la enolasa de levadura, esto indica que la energía asociada con los cambios de conformación entre el estado y el estado intermediario de ambas proteínas es similar.

La enzima hpENO no mostró la actividad enzimática en ninguna de las condiciones evaluadas. La explicación de la falta de actividad enzimática es compleja, no obstante con base en el análisis de estructura primaria de la enzima es

posible señalar que la falta de actividad no es originada por cambios o falta de aminoácidos importantes en sitios activos de la enzima, ya que estos se encuentran conservados. Sin embargo fueron observados varios cambios de aminoácidos fuera de los sitios activos conocidos y así como en dominios funcionales (bucles L1, L2 y L3) recientemente relacionados con cambios de conformación en la enzima.

El análisis genómico de *H. pylori* reveló la ausencia de los genes enzimáticos de la vía de la glucólisis; *pyk*, piruvato quinasa; *pfk*, fosfofructoquinasa y *gnd*, 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Estos datos aunados a nula actividad de la enolasa reportada en este trabajo permiten insinuar que la enolasa perdió su capacidad catalítica derivado del no desarrollo de la ruta clásica de la glucólisis en *H. pylori*.

Se identificaron cuatro sitios blancos en la enolasa de *H. pylori* que pueden ser empleados como diana para compuestos con potencial farmacéutico. Los sitio 1 (PHE162 ASN214 ASN215 VAL216 LEU257 GLU260 LYS262 LEU264 LEU269 TYR272 TYR273 GLU275 LEU276 LYS279) y 4 (SER301 GLY305 ARG306 LEU310 GLY326 ILE327 ASN330 ILE331 ALA332 ASN333 HIS358 ALA359 TYR360 LYS424) sobresalen especialmente ya que más de la mitad de los aminoácidos que conforman el sitio blanco están presentes solo en la secuencia de la enolasa de *H.pylori*.

10. PERSPECTIVAS

Es necesaria más experimentación para determinar otras probables funciones de la hpENO en este patógeno. Esta información podría ser útil para proponer estrategias novedosas para combatir la infección por *H. pylori*.

11. BIBLIOGRAFÍA

Adams BL, Bates TC, Oliver JD (2003) Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Appl Environ Microbiol* 69: 7462-6.

Agarwal S, Kulshreshtha P, Bambah Mukku D, Bhatnagar R (2008) alpha-Enolase binds to human plasminogen on the surface of *Bacillus anthracis*. *Biochim Biophys Acta* 1784: 986-94. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.03.017

Ahuja V, Sharma MP (2002) High recurrence rate of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Gastroenterology* 123: 653-4.

Alarcon T, Domingo D, Lopez-Brea M (1999) Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 12: 19-26.

Alm RA, Noonan B (2001) The Genome. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL (eds) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, Washington (DC)

Amieva MR, El-Omar EM (2008) Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 134: 306-23. doi: S0016-5085(07)02016-1 [pii] 10.1053/j.gastro.2007.11.009

Andersen LP, Wadstrom T (2001) Basic Bacteriology and Culture. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL (eds) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, Washington (DC)

Anderson SR, Anderson VE, Knowles JR (1994) Primary and secondary kinetic isotope effects as probes of the mechanism of yeast enolase. *Biochemistry* 33: 10545-55.

Avilan L, Gualdron-Lopez M, Quinones W, Gonzalez-Gonzalez L, Hannaert V, Michels PA, Concepcion JL (2011) Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme Res* 2011: 932549. doi: 10.4061/2011/932549

Awuku YA, Simpong DL, Alhassan IK, Tuoyire DA, Afaa T, Adu P (2017) Prevalence of helicobacter pylori infection among children living in a rural setting in Sub-Saharan Africa. *BMC Public Health* 17: 360. doi: 10.1186/s12889-017-4274-z

Azevedo NF, Almeida C, Cerqueira L, Dias S, Keevil CW, Vieira MJ (2007a) Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appl Environ Microbiol* 73: 3423-7. doi: 10.1128/AEM.00047-07

Azevedo NF, Guimaraes N, Figueiredo C, Keevil CW, Vieira MJ (2007b) A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *Crit Rev Microbiol* 33: 157-69. doi: 10.1080/10408410701451922

Baltrus DA, Amieva MR, Covacci A, Lowe TM, Merrell DS, Ottemann KM, Stein M, Salama NR, Guillemin K (2009) The complete genome sequence of *Helicobacter pylori* strain G27. *J Bacteriol* 191: 447-8. doi: JB.01416-08 [pii] 10.1128/JB.01416-08

Bednarz-Misa I, Pietkiewicz J, Banaś T, Gamian A (2009) Enolase from *Klebsiella pneumoniae* and Human Muscle Cells. I. Purification and Comparative Molecular Studies

Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS, Hammerschmidt S (2001) alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40: 1273-87.

Bergmann S, Wild D, Diekmann O, Frank R, Bracht D, Chhatwal GS, Hammerschmidt S (2003) Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 49: 411-23.

Bhowmick IP, Kumar N, Sharma S, Coppens I, Jarori GK (2009) *Plasmodium falciparum* enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization. *Malar J* 8: 179. doi: 1475-2875-8-179 [pii] 10.1186/1475-2875-8-179

Bjorkholm B, Sjolund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, Andersson DI (2001) Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14607-12. doi: 10.1073/pnas.241517298

Bowden GA, Georgiou G (1990) Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 265: 16760-6.

Brown LM (2000) *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* 22: 283-97.

Bruce MG, Maarros HI (2008) Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 13 Suppl 1: 1-6. doi: 10.1111/j.1523-5378.2008.00631.x

Candela M, Biagi E, Centanni M, Turrone S, Vici M, Musiani F, Vitali B, Bergmann S, Hammerschmidt S, Brigidi P (2009) Bifidobacterial enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. *Microbiology* 155: 3294-303. doi: 10.1099/mic.0.028795-0

Ceremuga I, Seweryn E, Bednarz-Misa I, Pietkiewicz J, Jermakow K, Banas T, Gamian A (2014) Enolase-like protein present on the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* binds plasminogen. *Folia Microbiol (Praha)* 59: 391-7. doi: 10.1007/s12223-014-0311-9

Chalk PA, Roberts AD, Blows WM (1994) Metabolism of pyruvate and glucose by intact cells of *Helicobacter pylori* studied by ¹³C NMR spectroscopy. *Microbiology* 140 (Pt 8): 2085-92. doi: 10.1099/13500872-140-8-2085

Chauhan DS, Chandra S, Gupta A, Singh TR (2012) Molecular modelling, docking and interaction studies of human-plasminogen and salmonella enolase with enolase inhibitors. *Bioinformation* 8: 185-8. doi: 10.6026/97320630008185

Cork AJ, Jergic S, Hammerschmidt S, Kobe B, Pancholi V, Benesch JL, Robinson CV, Dixon NE, Aquilina JA, Walker MJ (2009) Defining the structural basis of human plasminogen binding by streptococcal surface enolase. *J Biol Chem* 284: 17129-37. doi: 10.1074/jbc.M109.004317

Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284: 1328-33.

da Silva Giotto MT, Hannaert V, Vertommen D, de ASNMV, Rider MH, Michels PA, Garratt RC, Rigden DJ (2003) The crystal structure of *Trypanosoma brucei* enolase: visualisation of the inhibitory metal binding site III and potential as target for selective, irreversible inhibition. *J Mol Biol* 331: 653-65.

Day IN, Peshavaria M, Quinn GB (1993) A differential molecular clock in enolase isoprotein evolution. *J Mol Evol* 36: 599-601.

Dewhirst FE, Fox JG, On SL (2000) Recommended minimal standards for describing new species of the genus *Helicobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 6: 2231-7.

Diaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, Garcia-Melero A, Lopez-Aleman R (2012) alpha-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol* 2012: 156795. doi: 10.1155/2012/156795

Dinovo EC, Boyer PD (1971) Isotopic probes of the enolase reaction mechanism. *J Biol Chem* 246: 4586-4593.

Dore MP, Bilotta M, Vaira D, Manca A, Massarelli G, Leandro G, Atzei A, Pisanu G, Graham DY, Realdi G (1999) High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in shepherds. *Dig Dis Sci* 44: 1161-4.

Duquerroy S, Camus C, Janin J (1995) X-ray structure and catalytic mechanism of lobster enolase. *Biochemistry* 34: 12513-23.

Ehinger S, Schubert WD, Bergmann S, Hammerschmidt S, Heinz DW (2004) Plasmin(ogen)-binding alpha-enolase from *Streptococcus pneumoniae*: crystal structure and evaluation of plasmin(ogen)-binding sites. *J Mol Biol* 343: 997-1005. doi: 10.1016/j.jmb.2004.08.088

Facincani AP, Ferro JA, Pizauro JM, Pereira HA, de Macedo Lemos EG, do Prado AL, Ferro MI (2003) Carbohydrate metabolism of *Xylella fastidiosa*:

Detection of glycolytic and pentose phosphate pathway enzymes and cloning and expression of the enolase gene. *Genetics and Molecular Biology* 26: 203-211.

Faller LD, Baroudy BM, Johnson AM, Ewall RX (1977) Magnesium ion requirements for yeast enolase activity. *Biochemistry* 16: 3864-9.

Falush D, Kraft C, Taylor NS, Correa P, Fox JG, Achtman M, Suerbaum S (2001) Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15056-61. doi: 10.1073/pnas.251396098

Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Megraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S (2003) Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299: 1582-5. doi: 10.1126/science.1080857

Fox JG (1995) Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 9 Suppl 2: 93-103.

Fox JG, Perkins S, Yan L, Shen Z, Attardo L, Pappo J (1996) Local immune response in *Helicobacter pylori*-infected cats and identification of *H. pylori* in saliva, gastric fluid and faeces. *Immunology* 88: 400-6.

Fu Y, Zepeda-Gurrola RC, Aguilar-Gutierrez GR, Lara-Ramirez EE, De Luna-Santillana EJ, Rodriguez-Luna IC, Sanchez-Varela A, Carreno-Lopez R, Moreno-Medina VR, Rodriguez-Perez MA, Lopez-Vidal Y, Guo X (2014) The detection of inherent homologous recombination between repeat sequences in *H. pylori* 26695 by the PCR-based method. *Curr Microbiol* 68: 211-9. doi: 10.1007/s00284-013-0466-7

Goodwin CS, Armstrong JA (1990) Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9: 1-13.

Graham DY, Shiotani A (2008) New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 5: 321-31. doi: 10.1038/ncpgasthep1138

Greenfield NJ (2006a) Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc* 1: 2527-35. doi: 10.1038/nprot.2006.204

Greenfield NJ (2006b) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* 1: 2876-90. doi: 10.1038/nprot.2006.202

Grubel P, Huang L, Masubuchi N, Stutzenberger FJ, Cave DR (1998) Detection of *Helicobacter pylori* DNA in houseflies (*Musca domestica*) on three continents. *Lancet* 352: 788-9. doi: 10.1016/S0140-6736(05)60683-6

Han X, Ding C, Chen H, Hu Q, Yu S (2012) Enzymatic and biological characteristics of enolase in *Brucella abortus* A19. *Mol Biol Rep* 39: 2705-11. doi: 10.1007/s11033-011-1025-6

Hannaert V, Albert MA, Rigden DJ, da Silva Giotto MT, Thiemann O, Garratt RC, Van Roy J, Opperdoes FR, Michels PA (2003) Kinetic characterization, structure modelling studies and crystallization of *Trypanosoma brucei* enolase. *Eur J Biochem* 270: 3205-13.

Hazell SL, Mitchell HM, Hedges M, Shi X, Hu PJ, Li YY, Lee A, Reiss-Levy E (1994) Hepatitis A and evidence against the community dissemination of *Helicobacter pylori* via feces. *J Infect Dis* 170: 686-9.

Henderson B, Martin A (2013) Bacterial moonlighting proteins and bacterial virulence. *Curr Top Microbiol Immunol* 358: 155-213. doi: 10.1007/82_2011_188

Hernandez-Perez L, Depardon F, Fernandez-Ramirez F, Sanchez-Trujillo A, Bermudez-Cruz RM, Dangott L, Montanez C (2011) alpha-Enolase binds to RNA. *Biochimie* 93: 1520-8. doi: 10.1016/j.biochi.2011.05.007

Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC (2017) Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 153: 420-429. doi: 10.1053/j.gastro.2017.04.022

Hosaka T, Meguro T, Yamato I, Shirakihara Y (2003) Crystal structure of *Enterococcus hirae* enolase at 2.8 Å resolution. *J Biochem* 133: 817-23.

Jones MN, Holt RG (2007) Cloning and characterization of an alpha-enolase of the oral pathogen *Streptococcus mutans* that binds human plasminogen. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 924-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.098

Kaberdin VR, Lin-Chao S (2009) Unraveling new roles for minor components of the *E. coli* RNA degradosome. *RNA Biol* 6: 402-5.

Kang HJ, Jung S-K, Kim SJ, Chung SJ (2008) Structure of human [alpha]-enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme. *Acta Crystallographica Section D* 64: 651-657. doi: doi:10.1107/S0907444908008561

Karbassi F, Quiros V, Pancholi V, Kornblatt MJ (2010) Dissociation of the octameric enolase from *S. pyogenes*--one interface stabilizes another. *PLoS One* 5: e8810. doi: 10.1371/journal.pone.0008810

Keller A, Peltzer J, Carpentier G, Horvath I, Olah J, Duchesnay A, Orosz F, Ovadi J (2007) Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1770: 919-26. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.01.015

Kelly SM, Jess TJ, Price NC (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1751: 119-39. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005

Kelly SM, Price NC (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* 1: 349-84.

Kim MS, Choi SH, Lee EH, Nam YK, Kim SK, Kim KH (2007) α -enolase, a plasmin(ogen) binding and cell wall associating protein from a fish pathogenic *Streptococcus iniae* strain. *Aquaculture* 265: 55-60.

Kornblatt MJ (2005) Changing the metal ion selectivity of rabbit muscle enolase by mutagenesis: effects of the G37A and G41A mutations. *Biochim Biophys Acta* 1748: 20-5. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.11.020

Kotera H, Kaneko H, Mitsuma T (1993) The possibility of transendoscopic transmission of *Helicobacter pylori* and the method of disinfection of endoscopic instruments. *Nihon Rinsho* 51: 3120-6.

Kuhnel K, Luisi BF (2001) Crystal structure of the *Escherichia coli* RNA degradosome component enolase. *J Mol Biol* 313: 583-92. doi: 10.1006/jmbi.2001.5065
S0022-2836(01)95065-X [pii]

Kustrzeba-Wojcicka I, Golczak M (2000) Enolase from *Candida albicans*-- purification and characterization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126: 109-20.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.

Lakowicz JR (2006) Protein Fluorescence. In: Springer (ed) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Boston, MA

Larsen TM, Wedekind JE, Rayment I, Reed GH (1996) A carboxylate oxygen of the substrate bridges the magnesium ions at the active site of enolase: structure of the yeast enzyme complexed with the equilibrium mixture of 2-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* 35: 4349-58. doi: 10.1021/bi952859c

Lebioda L, Stec B (1991) Mechanism of enolase: the crystal structure of enolase-Mg²⁺-2-phosphoglycerate/phosphoenolpyruvate complex at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 30: 2817-22.

Lebioda L, Stec B, Brewer JM (1989) The structure of yeast enolase at 2.25-Å resolution. An 8-fold beta + alpha-barrel with a novel beta beta alpha alpha (beta alpha)₆ topology. *J Biol Chem* 264: 3685-93.

Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M (2007) An African origin for

the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445: 915-918. doi: 10.1038/nature05562

Lopez-Villar E, Monteoliva L, Larsen MR, Sachon E, Shabaz M, Pardo M, Pla J, Gil C, Roepstorff P, Nombela C (2006) Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. *Proteomics* 6 Suppl 1: S107-18. doi: 10.1002/pmic.200500479

Lu Q, Lu H, Qi J, Lu G, Gao GF (2012) An octamer of enolase from *Streptococcus suis*. *Protein Cell* 3: 769-80. doi: 10.1007/s13238-012-2040-7

Lung J, Liu KJ, Chang JY, Leu SJ, Shih NY (2010) MBP-1 is efficiently encoded by an alternative transcript of the ENO1 gene but post-translationally regulated by proteasome-dependent protein turnover. *FEBS J* 277: 4308-21. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07819.x

Luning G, et al. (1989) *Campylobacter pylori* becomes *Helicobacter pylori*. *Lancet* 2: 1019-20.

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.

Marshall BJ, McCallum RW, Prakash C (1987) *Campylobacter pyloridis* and gastritis. *Gastroenterology* 92: 2051.

Marshall BJ, Warren JR (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-5.

Megraud F (2012) The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: the comeback of bismuth-based quadruple therapy. *Therap Adv Gastroenterol* 5: 103-9. doi: 10.1177/1756283X11432492

Merz JKM, Ringe D, Reynolds CH (2010) *Drug Design Structure- and Ligand-Based Approaches*. Cambridge University Press, Cambridge

Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL (2001) Morphology and Ultrastructure. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL (eds) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, Washington (DC)

Molina-Infante J, Corti R, Doweck J, McNicholl AG, Gisbert JP (2017) Avances recientes en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana* 47: 75-85.

Moreno-Vargas LM, Carrillo-Ibarra N, Arzeta-Pino L, Benitez-Cardoza CG (2011) Thermal unfolding of apo- and holo-enolase from *Saccharomyces cerevisiae*: different mechanisms, similar activation enthalpies. *Int J Biol Macromol* 49: 871-8. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.07.021

Moss SF (2017) The Clinical Evidence Linking *Helicobacter pylori* to Gastric Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 3: 183-191. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.12.001

Mundodi V, Kucknoor AS, Alderete JF (2008) Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 76: 523-31. doi: 10.1128/IAI.01352-07

Murakami K, Sakurai Y, Shiino M, Funao N, Nishimura A, Asaka M (2016) Vonoprazan, a novel potassium-competitive acid blocker, as a component of first-line and second-line triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a phase III, randomised, double-blind study. *Gut* 65: 1439-46. doi: 10.1136/gutjnl-2015-311304

Newman JA, Hewitt L, Rodrigues C, Solovyova AS, Harwood CR, Lewis RJ (2012) Dissection of the network of interactions that links RNA processing with glycolysis in the *Bacillus subtilis* degradosome. *J Mol Biol* 416: 121-36. doi: 10.1016/j.jmb.2011.12.024

On S, Lee A, O'Rourke J, Dewhirst F, Paster B, Fox J, Vandamme P (2005) Genus I. *Helicobacter* Goodwin, Armstrong, Chilvers, Peters, Collins, Sly, McConnell, Harper 1989a, 403, vp emend. Vandamme, Falsen, Rossau, Hoste, Segers, Tytgat and De Ley 1991a, 100. In: Brenner DJ, Krieg NR, Garrity GM, Staley JT, Boone DR, Vos P, Goodfellow M, Rainey FA, Schleifer K-H (eds) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer US, pp 1169-1189

Osipiuk J, Gu M, Kwon K, Anderson WF, Joachimiak A Phosphopyruvate hydratase from *Campylobacter jejuni*. To be published

Owen RJ (1998) *Helicobacter*--species classification and identification. *Br Med Bull* 54: 17-30.

Pajares Garcia JM, Pajares-Villarroya R, Gisbert JP (2007) [*Helicobacter pylori* infection: antibiotic resistance]. *Rev Esp Enferm Dig* 99: 63-70.

Pal-Bhowmick I, Krishnan S, Jarori GK (2007) Differential susceptibility of *Plasmodium falciparum* versus yeast and mammalian enolases to dissociation into active monomers. *FEBS J* 274: 1932-45. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05738.x

Pal-Bhowmick I, Sadagopan K, Vora HK, Sehgal A, Sharma S, Jarori GK (2004) Cloning, over-expression, purification and characterization of *Plasmodium falciparum* enolase. *Eur J Biochem* 271: 4845-54. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04450.x

Pancholi V (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 58: 902-20.

Perez-Montfort R, de Gomez-Puyou MT, Gomez-Puyou A (2002) The interfaces of oligomeric proteins as targets for drug design against enzymes from parasites. *Curr Top Med Chem* 2: 457-70.

Pietkiewicz J, Gamian A, Staniszewska M, Danielewicz R (2009) Inhibition of human muscle-specific enolase by methylglyoxal and irreversible formation of advanced glycation end products. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24: 356-64. doi: 10.1080/14756360802187679

Poyner RR, Cleland WW, Reed GH (2001) Role of metal ions in catalysis by enolase: an ordered kinetic mechanism for a single substrate enzyme. *Biochemistry* 40: 8009-17.

Ramirez-Ramos A, Sanchez-Sanchez R (2009) *Helicobacter pylori* 25 years after (1983 -2008): epidemiology, microbiology, pathogenics, diagnostics and treatment. *Rev Gastroenterol Peru* 29: 158-70.

Ramon A, Senorale-Pose M, Marin M (2014) Inclusion bodies: not that bad. *Front Microbiol* 5: 56. doi: 10.3389/fmicb.2014.00056

Robinson K, Letley DP, Kaneko K (2017) The Human Stomach in Health and Disease: Infection Strategies by *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol Immunol* 400: 1-26. doi: 10.1007/978-3-319-50520-6_1

Rodrigues JV, Henriques BJ, Lucas TG, Gomes CM (2012) Cofactors and metabolites as protein folding helpers in metabolic diseases. *Curr Top Med Chem* 12: 2546-59.

Salazar N, Souza MC, Biasoli AG, Silva LB, Barbosa AS (2017) The multifaceted roles of *Leptospira* enolase. *Res Microbiol* 168: 157-164. doi: 10.1016/j.resmic.2016.10.005

Sanchez-Miguel DS, Romero-Jimenez J, Reyes-Lopez CA, Cabrera-Avila AL, Carrillo-Ibarra N, Benitez-Cardoza CG (2010) Chemical unfolding of enolase from *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a three-state model. *Protein J* 29: 1-10. doi: 10.1007/s10930-009-9215-y

Sasaki K, Tajiri Y, Sata M, Fujii Y, Matsubara F, Zhao M, Shimizu S, Toyonaga A, Tanikawa K (1999) *Helicobacter pylori* in the natural environment. *Scand J Infect Dis* 31: 275-9.

Schein CH, Noteborn MH (1988) Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia Coli* is Favored by Lower Growth Temperature. *Nature Biotechnology* 291 - 294 291 - 294.

Sharma V, Gupta R, Jhingran A, Singh BP, Sridhara S, Gaur SN, Arora N (2006) Cloning, recombinant expression and activity studies of a major allergen "enolase" from the fungus *Curvularia lunata*. *J Clin Immunol* 26: 360-9. doi: 10.1007/s10875-006-9032-4

Solnick JV, O'Rourke JL, Vandamme P, Lee A (2006) The Genus *Helicobacter*. *Prokaryotes* vol 7, pp 139–177

Solnick JV, Vandamme P (2001) Taxonomy of the *Helicobacter* Genus. doi: NBK2463 [bookaccession]

Stephen LW On, Adrian Lee, Jani L O'Rourke, Floyd E Dewhirst, Bruce J Paster, Fox JG, Vandamme P (2005) Genus I : *Helicobacter* Goodwin, Armstrong, Chilvers, Peters, Collins, Sly, McConnell, Harper 1989a, 403(VP) emend. Vandamme, Falsen, Rossau, Hoste, Segers, Tytgat and De Ley 1991a, 100. In: Don J Brenner, Noel R Krieg, Staley JT, Garrity GM (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2 : the Proteobacteria, part C : the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria

Suerbaum S, Josenhans C (2007) *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol* 5: 441-52. doi: 10.1038/nrmicro1658

Sundstrom P, Aliaga GR (1992) Molecular cloning of cDNA and analysis of protein secondary structure of *Candida albicans* enolase, an abundant, immunodominant glycolytic enzyme. *J Bacteriol* 174: 6789-99. doi: 10.1128/jb.174.21.6789-6799.1992

Tytgat GN (1995) Endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 9 Suppl 2: 105-10.

Vanegas G, Quinones W, Carrasco-Lopez C, Concepcion JL, Albericio F, Avilan L (2007) Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res* 101: 1511-6. doi: 10.1007/s00436-007-0668-7

Varon C, Mosnier JF, Lehours P, Matysiak-Budnik T, Megraud F (2009) Gastric carcinogenesis and *Helicobacter pylori* infection. *Methods Mol Biol* 511: 237-65. doi: 10.1007/978-1-59745-447-6_10

Verlinde CL, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Perie JJ, Fothergill-Gilmore LA, Opperdoes FR, Gelb MH, Hol WG, Michels PA (2001) Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat* 4: 50-65. doi: S1368-7646(00)90177-8 [pii] 10.1054/drup.2000.0177

Vora HK, Shaik FR, Pal-Bhowmick I, Mout R, Jarori GK (2009) Effect of deletion of a plant like pentapeptide insert on kinetic, structural and

immunological properties of enolase from *Plasmodium falciparum*. *Arch Biochem Biophys* 485: 128-38. doi: 10.1016/j.abb.2009.02.012

Warren JR, Marshall B (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1: 1273-5.

Waugh DS (2011) An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* 80: 283-93. doi: 10.1016/j.pep.2011.08.005

Wescott HH, Zuniga ES, Bajpai A, Trujillo C, Ehrt S, Schnappinger D, Roberts DM, Parish T (2018) Identification of Enolase as the Target of 2-Aminothiazoles in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol* 9: 2542. doi: 10.3389/fmicb.2018.02542

Whiting GC, Evans JT, Patel S, Gillespie SH (2002) Purification of native alpha-enolase from *Streptococcus pneumoniae* that binds plasminogen and is immunogenic. *J Med Microbiol* 51: 837-43. doi: 10.1099/0022-1317-51-10-837

Wold F, Ballou CE (1957) Studies on the enzyme enolase. I. Equilibrium studies. *J Biol Chem* 227: 301-12.

Wu W, Yang Y, Sun G (2012) Recent Insights into Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori* Eradication. *Gastroenterol Res Pract* 2012: 723183. doi: 10.1155/2012/723183

Wu Y, Wang C, Lin S, Wu M, Han L, Tian C, Zhang X, Zang J (2015) Octameric structure of *Staphylococcus aureus* enolase in complex with phosphoenolpyruvate. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71: 2457-70. doi: 10.1107/S1399004715018830

Yang J, Qiu C, Xia Y, Yao L, Fu Z, Yuan C, Feng X, Lin J (2010) Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase which is highly expressed at the schistosomulum stage. *Parasitol Res* 107: 667-77. doi: 10.1007/s00436-010-1913-z

Yu CH, Dang Y, Zhou Z, Wu C, Zhao F, Sachs MS, Liu Y (2015) Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-translational Protein Folding. *Mol Cell* 59: 744-54. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.018

Zakrzewicz D, Bergmann S, Didiasova M, Giaimo BD, Borggreffe T, Mieth M, Hocke AC, Lochnit G, Schaefer L, Hammerschmidt S, Preissner KT, Wygrecka M (2016) Host-derived extracellular RNA promotes adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to endothelial and epithelial cells. *Sci Rep* 6: 37758. doi: 10.1038/srep37758

Zhang E, Brewer JM, Minor W, Carreira LA, Lebioda L (1997) Mechanism of enolase: the crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 36: 12526-34. doi: 10.1021/bi9712450

Zhao S, Choy BS, Kornblatt MJ (2008) Effects of the G376E and G157D mutations on the stability of yeast enolase--a model for human muscle enolase deficiency. *FEBS J* 275: 97-106. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06177.x