

Análisis topológico del interactoma de *Helicobacter pylori* revela proteínas topológicamente esenciales: identificación de blancos terapéuticos

Topological analysis of the interactome of *Helicobacter pylori* reveals topologically essential proteins: identification of therapeutic targets

Andrés Julián Gutiérrez E., Lic, MSc,¹ Martín Alonso Bayona R., MSc.²

¹ Licenciado en Biología, Maestría en Ciencias Básicas Médicas. Docente Investigador Facultad de Medicina U.D.C.A., Coordinador Laboratorio de Biología Molecular, Grupo de Ciencias Básicas y Genética Humana Aplicada (GIBGA). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales-U.D.C.A., Bogotá, Colombia. E-mail: andresgutierrez@colombia.com

² Bacteriólogo, Maestría en Microbiología. Docente Investigador Facultad de Medicina U.D.C.A. Grupo de Ciencias Básicas y Genética Humana Aplicada (GIBGA), Coordinador Área Básico-Médica. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales - U.D.C.A., Bogotá, Colombia. E-mail: mabayona@udca.edu.co

Financiación

Convocatoria interna de Vicerrectoría de investigaciones. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales - U.D.C.A.

Fecha recibido: 08-07-13

Fecha aceptado: 19-12-13

Resumen

La *Helicobacter pylori* ha colonizado la mitad de la población mundial; su infección presenta una prevalencia del 70% al 90% en países en vía de desarrollo y del 25% al 50% en países industrializados. Está establecido que la infección se asocia con el desarrollo de gastritis crónica, úlcera gástrica y duodenal y con cáncer de estómago en el humano. *Helicobacter pylori* fue la primera bacteria patógena para la cual se dedujo el interactoma y por análisis topológicos se identificaron 702 proteínas involucradas en 1359 interacciones con una cobertura del 97,7% con escala libre; es decir, que el interactoma contiene proteínas topológicamente esenciales. Sin embargo, dichas proteínas y sus asociaciones fisiológicas no han sido descritas, perdiendo de esta manera la posibilidad de identificar posibles blancos terapéuticos. Con el objetivo de identificar proteínas topológicamente esenciales se realizó una reconstrucción del interactoma de la cepa *H. pylori* ATCC 26695 empleando los complementos *BioNetBuilder* y *NetworkAnalyzer* de *Cytoscape* y la aplicación web *cytoHubba*. La reconstrucción presentó 896 proteínas y 2416 interacciones con una cobertura del 96% del proteoma ajustada a la distribución de ley de potencias, es decir, presentó escala libre. Usando *NetworkAnalyzer* y la aplicación *Hubba* se identificaron proteínas esenciales según los parámetros K y BC; con las que se construyó una subred. El análisis de esta subred mostró que el sistema de secreción tipo IV interactúa con subsistemas metabólicos de lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos por medio de proteínas, para las cuales esta interacción no había sido sugerida. Además, estas interacciones son explicables por perfiles de expresión dependientes del pH, adhesión y homeostasis del hierro; lo cual permite complementar tanto la biología básica de la cepa como postular nuevos blancos terapéuticos putativos.

Palabras clave

Helicobacter pylori, interactoma, teoría de grafos, nodos topológicos, sistema de secreción tipo IV, blanco terapéutico.

INTRODUCCIÓN

La *Helicobacter pylori* ha colonizado el estómago de la mitad de la población mundial (1, 2); la prevalencia en adultos oscila entre 70% y 90% en países en desarrollo y entre 25% a 50% en países industrializados (3). Se sabe que la infección se asocia con gastritis crónica, úlcera gástrica y cáncer de estómago, mediada la adhesión de las cepas de la bacteria a las células epiteliales del hospedero (1, 2, 4-7). Sin embargo, no todas producen infección (8).

Una red de interacción está compuesta por nodos y por sus conexiones, dichos nodos se pueden distribuir al azar o seguir una distribución específica. Por ejemplo, escala libre (11), lo que significa que existen nodos que están más densamente conectados. La relación entre las propiedades topológicas de los nodos (genes o proteínas) y la esencialidad funcional está bien establecida (42). De hecho, existen programas bioinformáticos que permiten determinar este tipo de nodos a partir de un interactoma; ej. *Hubba* (33). El interactoma de la cepa ATCC 26695 de *Helicobacter pylori*

Abstract

Helicobacter pylori, which have colonized half the world's population, have a prevalence of 70% to 90 % in developing countries and 25% to 50 % in industrialized countries. It is well established that the infection is associated with the development of chronic gastritis, gastric and duodenal ulcers and stomach cancer in humans. *Helicobacter pylori* were the first pathogenic bacteria whose interactome was deduced. Topologic analysis identified 702 proteins involved in 1,359 interactions coverage of 97.7 % with scale-free networks. In other words, the interactome contains topologically essential proteins, however, because these proteins and their physiological associations have not been described, we cannot identify potential therapeutic targets. To identify topologically essential proteins we reconstructed the interactome of *H. pylori* strain ATCC 26695 using BioNetBuilder and Cytoscape NetworkAnalyzer the cytoHubba web application. The reconstruction presented 896 proteins and 2416 interactions with a coverage of 96 % of the proteome adjusted to the distribution of the power law. In other words, the reconstruction presented a scale-free network. We used NetworkAnalyzer and the Hubba application to identify essential proteins according to the BC and K parameters. On that basis we constructed a subnetwork. Analysis of this subnetwork showed that the type IV secretion system interacts with metabolic subsystems of lipids, amino acids and nucleic acids by means of proteins for which this interaction has not been suggested. Moreover, these interactions can be explained by profiles of expression that are dependent on pH, adhesion and iron homeostasis. This allows us to complements both the basic biology of the strain as well as to postulate putative new therapeutic targets.

Keywords

Helicobacter pylori, interactome, graph theory, topological nodes, type IV secretion system, therapeutic target.

mostró 1200 interacciones y cubrió 46% del proteoma (9). Posteriormente, reportaron 702 proteínas y 1359 interacciones con una cobertura del 97,7% (10); además que presentaba escala libre (10-13). También se logró validar bioquímicamente el 76% de dichas interacciones (14). A la fecha, se han caracterizado el complejo ureasa (15, 16), el complejo flagelar (17) y el complejo sistema secretor tipo IV (14, 18-20). Recientemente, se han sugerido interacciones proteicas que podrían retroalimentar la actividad de regulones específicos, por ejemplo Fur, RopD y choque térmico (21); pero ningún estudio ha determinado tanto la esencialidad topológica de proteínas en el interactoma que podrían derivar en la identificación de blancos terapéuticos como en su significado fisiológico.

En el presente estudio se construyó una subred de proteínas topológicamente esenciales que se proponen como blancos terapéuticos putativos. También se logró determinar la centralidad topológica del sistema secreción tipo IV y las interacciones proteicas que lo vinculan con subsistemas metabólicos. Estas interacciones ponen de manifiesto asociaciones fisiológicas explicables en el contexto de la expresión de genes bajo condiciones específicas de pH, adhesión y homeostasis del hierro.

MATERIALES Y MÉTODOS

La reconstrucción de la red se desarrolló con las versiones 2.8.2 (22) y 3.0.1 del programa *Cytoscape* (23). Se utilizó el complemento *BioNetBuilder* 2.0 (24) con el que se minaron

las bases de datos BIND (25), KEGG (26), MINT (27), Intact (28) y DIP 5.0 (29) en busca de datos de interacción de la cepa ATCC 26695 de *H. pylori*. Todos los nodos de la red fueron nombrados con código Uniprot (30) y se eliminaron los nodos y bucles repetidos.

Los parámetros topológicos evaluados fueron: grado (k), que indica qué tan conectado está un nodo con otros; la intermediación (BC), el número de veces que un nodo es visitado; la centralidad (CC) que indica cuales son los nodos más cercanos al centro de la red (31) empleando el complemento *NetworkAnalyzer* (32). Para determinar los centros topológicos se compararon los nodos con valores más altos para k y BC con los resultados obtenidos con Hubba <http://hub.iis.sinica.edu.tw/Hubba/> (33). Con los datos comparados se construyeron dos subredes: la 'subredk' integrada y la 'SubredDS', siguiendo el parámetro *Double Screen* (DS).

Se realizaron análisis de perturbación con el complemento *PerturbationAnalyzer* (35). Seguidamente, los nodos de la subredk integrada se mapearon contra los resultados obtenidos del análisis de perturbación y se seleccionaron solo aquellos nodos mapeados que presentaron un valor superior a 2 (34). Como control, la subredk integrada fue sometida a un análisis de interferencia usando el complemento *Interferece* 1,0 (36). Las perturbaciones se realizaron asumiendo que todos los nodos tienen aumentada su concentración 2. Cada nodo de la subredk integrada y la SubredDS fueron mapeados en Uniprot (30), KEGG (26), DEG *Database of Essential Genes* (37) y se hizo Blast (38)

contra una base de datos de humano y en *DrugBank* (39). Todos los análisis fueron llevados a cabo en una estación de trabajo bioinformática Dell T7600.

RESULTADOS

La red presentó 896 nodos, 2416 interacciones cubriendo el 96% del proteoma. El parámetro K y el número de nodos se correlacionan positivamente ($0,901$, $R^2 = 0,884$), lo que confirma su distribución según la ley de potencias (40) (figura 1). El top 50 de nodos según k mapeados en KEGG (26) indican que el 18% son proteínas hipotéticas, el 25% Cag8, Cag7, CagA y Cag-Alfa del sistema de secreción tipo IV; el 8% rpoBC, SpoT, Ndk y PyrF proteínas reguladoras. También se detectaron las proteínas FlgB, la proteína A del sistema UvrABC, CobB, HcpB, AspB y Bcp de varios subsistemas metabólicos. Finalmente, un 8% correspon-

dió a subsistemas metabólicos de síntesis de ácidos grasos como: AccD, AcpP, proteína similar a la lipasa y FabE. El top 50 para K según cytoHubba es similar, sin embargo, la valoración de cada nodo cambia y existen dos nodos diferentes correspondientes a glnA y feoB, como se muestra en la tabla 1 y figura 1B y C.

En el top 50 del parámetro BC el 30% son proteínas hipotéticas, un 8% son proteínas reguladoras, 6% del aparato flagelar como FlgB, PflA y FliS; un 10% corresponde a sistemas de reparación del ADN, replicación y degradación de ARN como la proteína A del sistema UvrABC, MutS2, TopA, rpoD y la Ribonucleasa J; un 6% al metabolismo sintético de lípidos como la proteína similar a lipasa, AcpP, FabE, un 8% a proteínas del metabolismo de aminoácidos como CobB, SdaA, AspB y la Delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa y un 24% por HcpB, feoB, selA, la proteína de unión al sustrato del transportador ABC, la

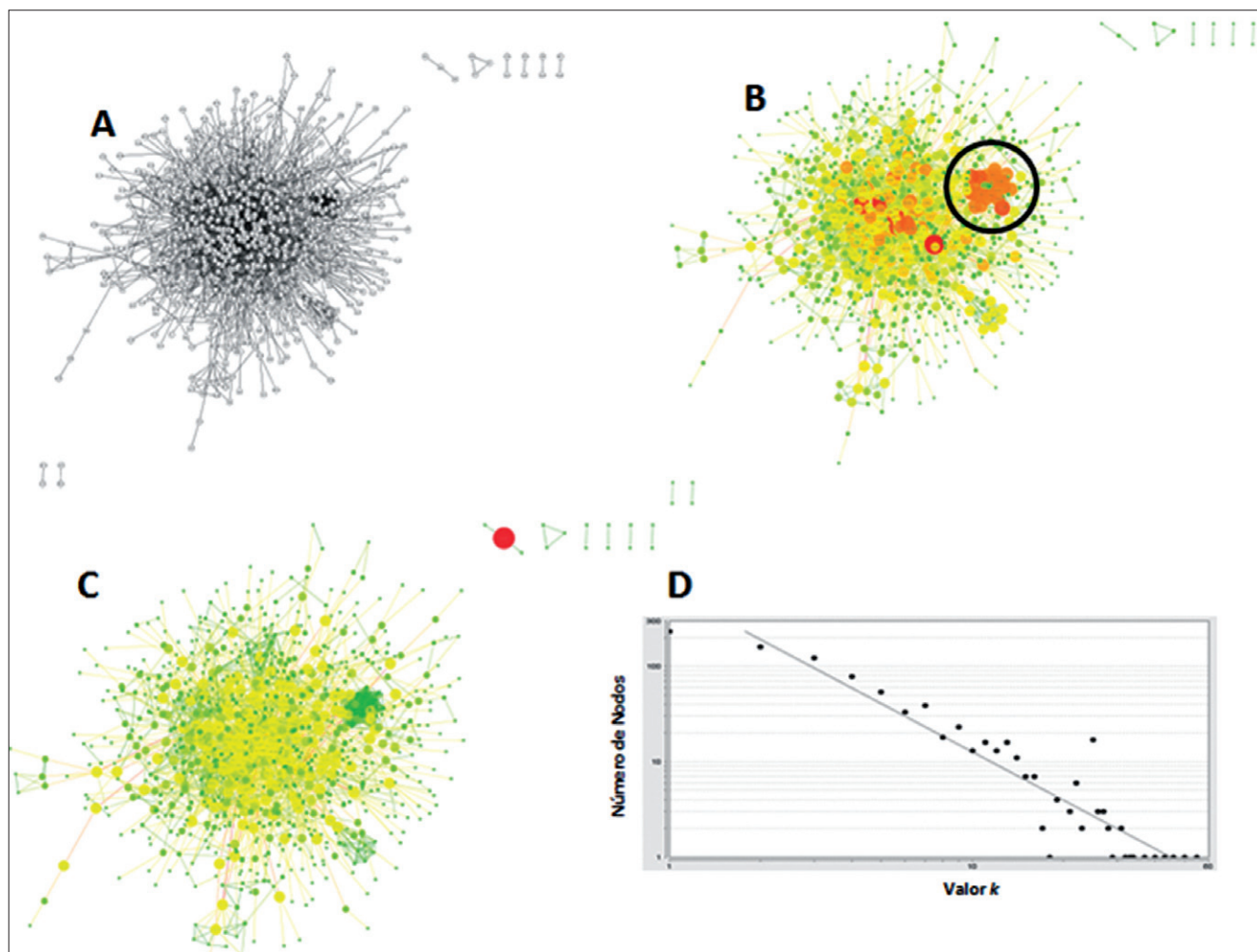


Figura 1. A. Vista general del interactoma de la cepa ATCC 26695 de *Helicobacter pylori*. B y C nodos mapeados en el interactoma según parámetros k y BC el círculo muestra el clúster del sistema de secreción tipo IV. D- La distribución de los nodos evidencia la ley de potencias de la red.

Tabla 1. Top 50 de nodos con valores K significativos para el interactoma de la cepa ATCC 26695 de *Helicobacter pylori*. El nombre se presenta como el código Uniprot de la proteína. * Nodos diferentes entre la aplicación hubba y los estadísticos derivados de cytoscape.

Nombre	K	CC	Descripción	HUBBA
O34810	55	0,34392157	Proteína no caracterizada	O34810
O25103	50	0,34097978	Betalactamasa HcpB	H64561
O26081	46	0,32785047	Proteína del cuerpo flagelar FlgB; hpy02040: Ensamblado flagelar.	O26081
O25520	43	0,34177708	Proteína no caracterizada	O25520
O25806	40	0,33992248	DNA-directa RNA polimerasa bifuncional hpy00230: Metabolismo de purinas; hpy00240: Metabolismo de pirimidinas	F64669
P55980	37	0,29340917	Antígeno inmunodominante cagA. Cag26; hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	C64588
O25263	34	0,3026225	Proteína de la isla de patogenicidad Cag8. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25263
O25262	33	0,30377555	Proteína de la isla de patogenicidad Cag7. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25262
O25546	32	0,30978453	Proteína no caracterizada.	O25546
Q7BK04	31	0,29972659	Proteína Cag alfa. Cag-alpha.	Q7BK04
O25162	31	0,32159883	Proteína no caracterizada	O25162
O25258	29	0,28072983	Proteína de la isla de patogenicidad Cag3. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25258
O25466	28	0,34541158	Proteína SpoT; hpy00230: metabolismo de purinas.	O25466
O25273	28	0,3026225	Proteína de la isla de patogenicidad Cag19. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25273
P56474	27	0,33019578	Proteína A del sistema UvrABC; hpy03420 Sistema de reparación del ADN.	O25270
O25270	27	0,28336026	Proteína de la isla de patogenicidad Cag16. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	C64677
O25849	27	0,30902044	Deacilasa dependiente de NAD. CobB; hpy00520: Metabolismo de azúcares de aminoácidos y nucleótidos.	A64608
P97245	26	0,28064	Proteína patogenicidad Cag12 (CagT. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25272
Q48252	26	0,28055022	Proteína patogenicidad Cag23 (CagE. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	D64586
O25272	26	0,29174983	Proteína de la isla de patogenicidad Cag18. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	H64587
O25278	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag25. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25260
O25260	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag5. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25278
O25264	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag9. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25274
O25271	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag17. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25265
O25275	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag21. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25264
O25266	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag11. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25276
P97227	25	0,27051203	Proteína patogenicidad Cag13 (CagS. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25269
O25261	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag6. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25275
O25265	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag10. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25266
O25257	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag1. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	F64586
O25269	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag15. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25268
O25259	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag4. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25271
O25268	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag14. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25261
O25277	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag24. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25277
O25276	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag22. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25257
O25274	25	0,27051203	Proteína de la isla de patogenicidad Cag20. hpy05120: Infección por <i>H. pylori</i> .	O25259
O24949	25	0,3026225	Proteína no caracterizada.	O24949
O25604	23	0,29870572	Acetil coenzima A carboxilasa carboxil transferasa. AccD. hpy00061: síntesis de ácidos grasos; hpy00620: metabolismo del piruvato; hpy00640: metabolismo del propanoato.	O25604
O25106	23	0,30085763	Lisozima	O25106
O25615	22	0,31763854	Proteína transportadora de grupo acilo. AcpP; Síntesis de lípidos.	O25615
P56075	22	0,29370395	Nucleósido difosfato cinasa. Ndk; hpy00230: Metabolismo de purinas; hpy00240: Metabolismo de pirimidinas.	O26022
O26022	22	0,32994733	Proteína similar a la lipasa.	O25383
O25383	22	0,26672749	Aspartato aminotransferasa. AspB; hpy00250: Metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato; hpy00270: Metabolismo de cisteína y metionina; hpy00330: Metabolismo de la arginina y prolina; hpy00350: Metabolismo de la tirosina; hpy00360: Metabolismo de la fenilalanina; hpy00400: Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano; hpy00401: Biosíntesis de novobiocina.	O25061
O24926	22	0,31535419	Proteína no caracterizada.	O24926
O25061	22	0,31011315	Proteína no caracterizada.	F64544
O26026	21	0,3240946	Proteína no caracterizada.	O25135
O25135	21	0,30409154	Proteína transportadora de Biotina carboxilo. FabE; hpy00061: Biosíntesis de ácidos grasos; hpy00620: Metabolismo del piruvato; hpy00640: Metabolismo del propanoato.	O26026
P55979	21	0,28511053	Peroxiredoxina putativa. Bcp.	H64536
O25031	19	0,30568142	Proteína no caracterizada.	H64583*
P56155	19	0,31558114	Orotidina 5' fosfato descarboxilasa. PyrF; hpy00240: metabolismo de pirimidinas.	G64605*

6-carboxi-5,6,7,8-tetrahidropterina sintetasa, TktA, CopA y proteínas del sistema de secreción y el complejo ureasa como son CagA, Cag 8, Cag 7, Cag Alfa y el canal ureI respectivamente. El mapeo entre los resultados del análisis de perturbación y top 50 K-B mostraron que: hcpB, flgB, rpoBC, CagA, Cag7, Cag alpha, Cag3, SpoT, UvrABC, Cag16, Cag8, AccD, AcpP, AspB, bcp, FabE, feoB, pyrF, queD, GppA y ureI son las proteínas topológicamente esenciales del interactoma de la cepa ATCC 26695 de *Helicobacter pylori* acompañadas de proteínas hipotéticas. Los análisis de interferencia mostraron que la red se fragmenta cuando alguno de estos centros topológico es eliminado (tabla 2, figura 2C).

El parámetro DS de cytoHubba agrupa los nodos en diferentes clústeres. El clúster 1 representa el metabolismo de piruvato, propanoato, síntesis de ácidos grasos y metabolismo central. De este, los nodos sin homólogo humano son: ppsA, FabH, la carboxinospermidina, FabE, Pta, porG que además es esencial en DEG (DEG10080201 ($E=5e-93$)), porA, porB y porD. El clúster 2 representa el metabolismo de aminoácidos y del nitrógeno; solo dos proteínas no tienen homólogos humano: panD y murl. El clúster 3 representa el metabolismo de ácidos nucleicos y aminoácidos puntuales. Dentro de las proteínas sin homólogos humanos están: la SurE y Gpt. El clúster 4 representa sistemas de replicación, reparación, recombinación; los nodos significativos según DEG son: la proteína (dnaN DEG10080082 ($E=0,0$)), la proteína HP1247 (DEG: DEG10080237 ($E=0,0$)), la proteína ropZ DEG (DEG10080134 ($E=2e-36$)) y HolB DEG (DEG10080229 ($E=8e-94$)). Finalmente, el clúster 5 representa el sistema de secreción tipo IV, además evidencia interacciones con la proteína queD y el Clúster 6 que representa el sistema ATP sintetasa (figura 2B).

DISCUSIÓN

Tener escala libre (40) significa que los nodos del interactoma siguen la distribución de ley de potencias (41); se sabe que estos nodos son esenciales, organizan la red y están conservados evolutivamente (42-46). Se identificaron nodos topológicos para el sistema de secreción tipo IV (SSTIV), la maquinaria flagelar, el sistema de respuesta al estrés, para sistemas de recombinación, reparación y transcripción, para homeostasis de Hierro, protección contra especies reactivas de oxígeno y para el sistema ureasa.

La subredk muestra que el sistema de secreción tipo IV (SSTIV) es un eje topológico central (figura 1 y 2) para el cual las proteínas Cag7, Cag8, Cag3, Cag16, Cag18, Cag Alfa y CagA son nodos topológicos para los que se han confirmado interacciones experimentalmente (18, 47). Estos nodos cumplen funciones esenciales para la dinámica molecular del SSTIV. Puntualmente, Cag18, Cag19 y Cag7 reconocen integrinas del huésped que favorecen la secreción de CagA (51-53) cuya translocación está mediada por Cag16 (54) y de esta manera CagA puede destruir la barrera epitelial y modificar vías de señalización del hospedero (48). Además, Cag3 es esencial para el ensamblado del SSTIV (49) y Cag Alfa facilita el transporte de sustratos (50).

Se sugiere que las interacciones entre CagA, Cag3, Cag8, Cag7 y Cag16 por un lado podrían regular el ensamblado del SSTIV y por el otro, vincularlo fisiológicamente con la homeostasis a metales, la aclimatación al medio ácido, la adhesión a la célula hospedera y el ensamblado flagelar. Estas sugerencias se apoyan en datos de expresión. Por ejemplo, cag16 y cag8 aumentan su expresión a pH 4.5 sin urea (55), la expresión de cag3 está influenciada por Fur y por la adhesión (56, 21) y cagA aumenta su expresión a pH

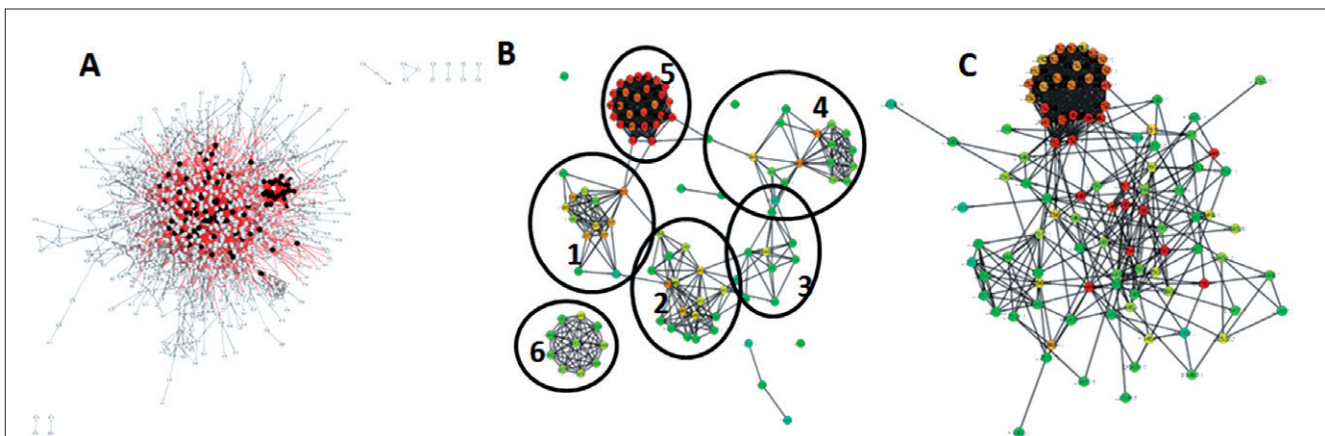


Figura 2. Vista de subredes con nodos densamente conectados. **A.** Mapeado en interactoma de nodos de subredTop100K en negro. **B.** SubredTop100DS; los círculos representan, Clúster 1: Metabolismo de piruvato, propanoato, síntesis de ácidos grasos y metabolismo central. Clúster 2: Metabolismo de aminoácidos y del nitrógeno. Clúster 3: Metabolismo de ácidos nucleicos y aminoácidos puntuales. Clúster 4: Replicación, reparación, recombinación. Clúster 5: Sistema de secreción tipo IV o isla de patogenicidad. Clúster 6: Sistema ATP sintetasa y fosforilación oxidativa. Los clústeres de proteínas que vinculan subsistemas metabólicos con el sistema de secreción tipo IV. **C.** SubredTop100K. Todas las subredes fueron generadas en HUBBA.

Tabla 2. Top 50 de nodos bajo análisis de perturbación del Interactoma de la cepa ATCC 26695 de *Helicobacter pylori*. DEG: database of essential genes, CA: código de acceso de homólogo humano usando Blast. NC: no caracterizada, NS: no significativo.

Uniprot	Perturbación	DEG/Valor E Blast	CA/ Valor E Blast	DrugBank
O34810	42	NO	NS	NO
O26081	32	NS	NS	NO
H64561	29	DEG10080059 / 3E-79	NP_001258468.1/8e-08	NO
O25546	24	NO	NS	NO
O25520	19	DEG10080145 / 2e-51	NS	NO
O25162	18	NO	NS	NO
O25106	17	NS	NS	NO
F64669, O25806	15	NO	NP_000928.1 / 2e-49	Rifampicina, Rifaximina, Rifabutina, Rifapentina, Tagetitoxina, Mixopironina B
H64536, P55979	15	NO	NP_005800.3/2e-10	Naftaleno-2,6-ácido disulfónico, 3-Sulfinoalanina.
O24949	13	NS	NS	NO
O25226	13	NO	NO	NO
C64677, O25849	12	NO	NP_001180196.1/4e-36	Suramina
G64605, O25396	11	NS	NS	NO
O24926	11	NO	NS	NO
O25031	10	NS	NS	NO
O25615	10	DEG10080088/2e-29	NP_004994.1/2e-08	Heptil 1-Tioexopiranosida
O25061	9	NO	NS	NO
A64608, P56474	7	NS	NS	NS
E64520, P56155	7	NO	NS	1-(5'-fosfo-Beta-D-Ribofuranosil); 6-Hidroxiuridina-5'-fosfato.
O25041	7	NO	NS	NO
O25940	7	NO	NS	NO
O26026	7	DEG10080300/e-112	NS	NO
C64698, P0A0V6	6	NO	NO	NO
O25604	6	NO	NP_000523.2/7e-13	NS
O34461	6	NO	NO	NO
C64588, P55980	5	NO	NO	NO
E64636, O25587	5	NO	NO	NO
G64630, P55981	5	NS	NO	NO
O24861	5	NO	NO	NO
O25107	5	NO	NO	NO
O26063	5	NS	NO	NO
E64711, O26061	4	NO	NS	Ácido 2'-deoxiuridílico 5-Bromo-2'-Deoxiuridina-5'-Monofosfato 5-Fluoro-2'-Deoxiuridina-5'-Monofosfato
O25055	4	NO	NO	NS
O25383	4	NO	NP_001008662.1/8e-43	NS
Q7BK04	4	NS	NO	Adenosina-5'-Difosfato
A41834, Q09068	3	NO	NO	NO
B64682	3	DEG10080250/6e-37	NO	NO
O24871	3	DEG10080004/ 2e-99	NO	NO
O25135	3	NO	NO	NO
O25140	3	NO	NO	NO
O25351	3	NO	NO	NO
O25416	3	NO	NO	NO
O25438	3	NO	NO	NO
A64709	2	NO	NO	NO
O25258	2	NO	NO	NO
O25262	2	NO	NO	NO
O25369	2	NO	NO	NO
O25466	2	DEG10080133 / 0.0	NS	Guanosina 5'-Difosfato 2':3'-Monofosfato cíclico.
O26022	2	NO	NO	NO
O25270	1	NO	NO	NO
O25272	1	NO	NO	NO

2.5 y es inducida por FlgS (57, 58). A su vez, la expresión de *cag3* y *cagA* está regulada por hierro en fase logarítmica de crecimiento (59) y esta situación se repite con otros genes *cag* cuyas proteínas no fueron identificadas aquí como nodos esenciales (21). Este estudio muestra que estas interacciones proteicas siguen un patrón fisiológico que podría implicar la existencia de formas de regulación del SSTIV que no han sido estudiadas y que estas proteínas podrían ser consideradas como blancos terapéuticos putativos.

Dentro de la maquinaria flagelar se identificaron dos proteínas como nodos topológicos que se proponen por primera vez como blancos terapéuticos putativos. Por un lado, la proteína FliS (60) fundamental para el ensamblado flagelar por que previene la polimerización prematura de flagelinas; de hecho, mutantes para FliS quedan paralizados y aflagelados (61-63) y por otro, la proteína FlgB ubicada entre el peptidoglicano y la membrana interna importante en la formación del conducto para la unidad flagelar móvil (60). Fisiológicamente, la expresión *flgB* aumenta tanto a pH 4,5 sin urea (55) como al adherirse a la célula (56), pero contradictoriamente, no está influenciada por FlgS (57) que se supone es su regulón maestro. De hecho, son HspR, HrcA y Fur los que influyen positivamente la expresión de *flgB* vinculando la proteína con respuesta al estrés y a la homeostasis de iones metálicos y una vez posibilitando la generación de nuevas hipótesis para trabajos experimentales. Por otra parte, la expresión de *fliS* está regulada por HrcA haciéndolo un gen que responde a eventos de estrés y por sigma 28; es decir, es un gen de regulación flagelar tipo III (21).

Por otro lado, en inanición y a bajo pH *H. pylori* produce ppGpp; un regulador que coordina adaptaciones para supervivencia (66) y los nodos topológicos SpoT, GppA y NdK identificados aquí representan la maquinaria enzimática completa para su procesamiento metabólico (64). Específicamente, bajo situación limitante de aminoácidos, choque aeróbico o exposición a medio ácido la adaptación ocurre mediante SpoT (65). Las cepas mutadas para SpoT no crecen en fase estacionaria, entran tempranamente a forma cocoide y no pueden sobrevivir a condiciones de estrés (65). Tanto la expresión de SpoT como de GppA se ven significativamente reprimidas cuando la bacteria se encuentra en su fase de crecimiento más virulenta (67, 58, 55). Experimentalmente, se determinó que SpoT es una proteína esencial para la cepa de la bacteria (tabla 2). Estas proteínas se pueden considerar como blancos terapéuticos muy novedosos puesto que permiten hipotetizar sobre el hecho de atacar las formas ambientales de la bacteria.

Otro de los nodos topológicos es la proteína A del sistema UvrABC. Tanto en *E. coli* como en *H. pylori*, esta proteína es la primera que reconoce los fragmentos de ADN a reparar (70, 71) y cepas mutantes para este gen no

sobreviven en luz ultravioleta y recombinan menos (72). Seguidamente, dentro de la maquinaria transcripcional se identificó un nodo correspondiente con la proteína RpoBC codificada por un gen fusionado que contiene las subunidades β y β' de la ARN polimerasa; la cual es plenamente funcional (68).

Finalmente, mencionar una serie de nodos topológicos miembros de una serie de sistemas variados. La proteína HpcB miembro de la familia de proteínas que hidrolizan anillos de penicilina y derivados del ácido cefalosporánico. Estructuralmente HpcB se considera única y se propone como una nueva familia de proteínas de unión a penicilina (69). Se sabe que el hierro es fundamental para la homeostasis de *Helicobacter pylori*; de hecho, la red de regulación transcripcional más intrincada está gobernada por Fur (21). Uno de los nodos corresponde a FeoB el principal transportador de hierro esencial para crecimiento y virulencia (73). Seguidamente, se identificó la proteína BCP una peroxiredoxina que protege la bacteria de especies reactivas de oxígeno; cepas mutantes para BCP no sobreviven en presencia de superóxidos y de hidroxiperoxidos orgánicos. Además, mueren después de tres semanas de colonización (74). Las proteínas AccD y AccP son necesarias para el metabolismo microaerofílico de *H. pylori* (75). Finalmente, la proteína UreI, un canal para urea ubicado en la membrana interna cuya expresión, aumenta cuando el medio disminuye de pH 7,4 a 4,5 sin urea (76, 55, 58) y a pH 4,5 FlgS controla su expresión (57). Se proponen los nodos FabE, QueD, AspB, CobB y PyrF como centros topológicos, además, se expone según DS que las proteínas FabE y QueD interactúan con Cag7, Cag8 y Cag12. En el presente artículo se expusieron las proteínas consideradas nodos topológicos para el interacción de la cepa ATCC 26695 de *Helicobacter pylori* y se proponen como nuevos blancos terapéuticos debido a su papel en la fisiología de la bacteria.

Agradecimientos

A la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales por la financiación del proyecto y al Doctor Carlos Barragán por sus sugerencias con la escritura del artículo.

REFERENCIAS

1. Loughlin M. Novel therapeutic targets in *Helicobacter pylori*. Expert Opin Ther Targets. 2003;7:725-35.
2. Dunn B, Cohen H, Blaser M. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev. 1997;10:720-41.
3. Konstantinos P, Gerassimos J. Pathogenesis of *Helicobacter Pylori* Infection: Colonization, Virulence Factors of the Bacterium and Immune and Non-immune Host Response. HOSPITAL CHRONICLES. 2012;7(1):32-37.

4. Amieva M, Salama N, Tompkins L, Falkow, S. *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell.Microbiol.* 2002;4:677-90.
5. Hazell S, Lee A, Brady L, and Hennessy W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J. Infect. Dis.* 1986;153:658-63.
6. Kwok T, Backert S, Schwarz H, Berger J, Meyer T. Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipperlike mechanism. *Infect. Immun.* 2002;70:2108-20.
7. Oh J, Karam S, Gordon J. Intracellular *Helicobacter pylori* in gastric epithelial progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005;102:5186-91.
8. Mbulaiteye S, Hisada M, EL-omar E. *Helicobacter pylori* associated global gastric cancer burden. *Front. Biosci.* 2009;14:1490-1504.
9. Rain J, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, Lenzen G, Petel F, Wojcik J, Schächter V, et al. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature.* 2001; 409 (6817):211-15.
10. Daniel W, Xiaohua H. Topological Analysis and Sub-Network Mining of Protein-Protein Interactions. In: David T. Research and Trends in Data Mining Technologies and Applications. USA: IGI Global; 2007: p. 209-40.
11. Barabasi A, Albert R. Emergence of scaling in random networks. *Science.* 1999;286: 509-12.
12. Newman M. The structure and function of complex networks. *SIAM Review.* 2003;45: 167-256.
13. Albert R, Jeong H, Barabasi A. Error and attack tolerance of complex networks. *Nature.* 2000;406: 378-82.
14. Terradot L, Durnell N, Li M, Ory J, Labigne A, Legrain P, Colland F, Waksman G. Biochemical characterization of protein complexes from the *Helicobacter pylori* protein interaction map: strategies for complex formation and evidence for novel interactions within type IV secretion systems. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3(8):809-19.
15. Fong Y, Wong H, Chuck C, Chen Y, Sun H, Wong K. Assembly of preactivation complex for urease maturation in *Helicobacter pylori*: crystal structure of UreF-UreH protein complex. *J Biol Chem.* 2011;286(50):43241-9.
16. Voland P, Weeks D, Marcus E, Prinz C, Sachs G, Scott D. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(1):G96-G106.
17. Lam W, Woo E, Kotaka M, Tam W, Leung Y, Ling T, Au S. Molecular interaction of flagellar export chaperone FliS and cochaperone HP1076 in *Helicobacter pylori*. *FASEB J.* 2010;24(10):4020-32.
18. Busler V, Torres V, McClain M, Tirado O, Friedman D, Cover T. Protein-protein interactions among *Helicobacter pylori* cag proteins. *J Bacteriol.* 2006;188 (13):4787-800.
19. Kutter S, Buhrdorf R, Haas J, Schneider-Brachert W, Haas R, Fischer W. Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J Bacteriol.* 2008;190 (6):2161-71.
20. Jurik A, Hausser E, Kutter S, Pattis I, Prassl S, Weiss E, Fischer W. The coupling protein Cagbeta and its interaction partner CagZ are required for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Infect Immun.* 2010;78(12):5244-51.
21. Danielli A, Amore G, Scarlato V. Built shallow to maintain homeostasis and persistent infection: insight into the transcriptional regulatory network of the gastric human pathogen *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog.* 2010;6(6):e1000938.
22. Smoot M, Ono K, Ruscheinski J, Wang P, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics.* 2011;27 (3):431-32.
23. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga N, Wang J, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13 (11):2498-2504.
24. Konieczka J, Drew K, Pine A, Belasco K, Davey S, Yatskievych T, et al. BioNetBuilder 2.0: bringing systems biology to chicken and other model organisms. *BMC Genomics.* 2009; 10 Suppl 2:S6. doi: 10.1186/1471-2164-10-S2-S6.
25. Bader G, Betel D, Hogue C. BIND: the Biomolecular Interaction Network Database. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(1):248-50.
26. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 2012;40 (Database issue): D109-14.
27. Licata L, Briganti L, Peluso D, Perfetto L, Iannuccelli M, Galeota E, et al. MINT, the molecular interaction database: 2012 update. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue): D857-61.
28. Kerrien S, Aranda B, Breuza L, Bridge A, Broackes-Carter F, Chen C, Duesbury M, et al. The IntAct molecular interaction database in 2012. *Nucleic Acids Res.* 2012;40 (Database issue): D841-46.
29. Xenarios I, Salwinski L, Duan X, Higney P, Kim S, Eisenberg D. DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(1):303-05.
30. Dimmer E, Huntley R, Alam-Faruque Y, Sawford T, O'Donovan C, Martin M, Bely B, et al. The UniProt-GO Annotation database in 2011. *Nucleic Acids Res.* 2012;40 (Database issue): D565-70.
31. Raman K. Construction and analysis of protein-protein interaction networks. *Autom Exp.* 2010;2 (1):2.
32. Assenov Y, Ramírez F, Schelhorn S, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics* 2008;24(2):282-84.
33. Lin C-Y, Chin C-H, Wu H-H, Chen S-H, Ho C-W, Ko M-T. Hubba: hub objects analyzer--a framework of interactome hubs identification for network biology. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue):W438-43.
34. Antal M, Böde C, Csermely P. Perturbation waves in proteins and protein networks: applications of percolation and

- game theories in signaling and drug design. *Curr Protein Pept Sci.* 2009;10 (2):161-72.
35. Li F, Li P, Xu W, Peng Y, Bo X, Wang S. PerturbationAnalyzer: a tool for investigating the effects of concentration perturbation on protein interaction networks. *Bioinformatics.* 2010;26 (2):275-77.
 36. <http://www.cbmc.it/~scardonig/interference/Interference.php>, Center for Biomedical Computing [sede web]. Italia: <http://www.cbmc.it> [Actualizada enero del 2010; accedido 25 de Abril de 2013]. Disponible en: <http://www.cbmc.it/~scardonig/interference/Interference.php>
 37. Zhang R, Lin Y. DEG 5.0, a database of essential genes in both prokaryotes and eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 2009;37 (Database issue):D455-58.
 38. Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389-3402.
 39. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D1035-41.
 40. Roy S. Systems biology beyond degree, hubs and scale-free networks: the case for multiple metrics in complex networks. *Syst Synth Biol* 2012;6(1-2):31-34.
 41. Barabasi A, Albert R. Emergence of scaling in random networks. *Science.* 1999;286:509-12.
 42. Jeong H, Mason S, Barabasi A, Oltvai Z. Lethality and centrality in protein networks. *Nature.* 2001;411:41-42.
 43. He X, Zhang J. Why do hubs tend to be essential in protein networks? *PLoS Genet.* 2006;2:e88.
 44. Albert R, Jeong H, Barabasi A. Error and attack tolerance of complex networks. *Nature.* 2000;406: 378-82.
 45. Han J, Bertin N, Hao T, Goldberg D, Berriz G, et al. Evidence for dynamically organized modularity in the yeast protein-protein interaction network. *Nature.* 2004;430: 88-93.
 46. Wuchty S, Almaas E. Peeling the yeast protein network. *Proteomics.* 2005;5: 444-49.
 47. Kutter S, Buhrdorf R, Haas J, Schneider-Brachert W, Haas R, Fischer W. Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J Bacteriol.* 2008;190 (6):2161-71.
 48. Wu J, Xu S, Zhu Y. *Helicobacter pylori* CagA: A Critical Destroyer of the Gastric Epithelial Barrier. *Dig Dis Sci.* 2013.
 49. Pinto-Santini D, Salama N. Cag3 is a novel essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system outer membrane subcomplex. *J.Bacteriol.* 2009;191(23):7343-52.
 50. Savvides S, Yeo H, Beck M, Blaesing F, Lurz R, Lanka E, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R, Waksman G. VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *Embo J.* 2003;22(9):1969-80.
 51. Jimenez L, Kutter S, Sewald X, Ertl C, Weiss E. et al. *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits b1 integrin in a novel RGD independent manner. *PLoS Pathog.* 2009;5: e1000684.
 52. Pham K, Weiss E, Jiménez L, Breithaupt U, Haas R, Fischer W. CagI is an essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system and forms a complex with CagL. *PLoS One.* 2012;7(4):e35341.
 53. Tegtmeyer N, Wessler S, Backert S. Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS J* 2011;278(8):1190-1202.
 54. Ling F, Wang X, Dai D, Yu M, Chen C, Qian J, Liu C, Zhang Y, Ding J, Guan X, Shao S. The *Helicobacter pylori* Protein CagM is Located in the Transmembrane Channel That is Required for CagA Translocation. *Curr Microbiol.* 2013;5.
 55. Wen Y, Marcus E, Matrubutham U, Gleeson M, Scott D, Sachs G. Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2003;71(10):5921-39.
 56. Kim N, Marcus E, Wen Y, Weeks D, Scott D, Jung H, et al. Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells. *Infect Immun.* 2004;72 (4):2358-68.
 57. Wen Y, Feng J, Scott D, Marcus E, Sachs G. The pH-responsive regulon of HP0244 (FlgS), the cytoplasmic histidine kinase of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2009;191(2):449-60.
 58. Merrell D, Goodrich M, Otto G, Tompkins L, Falkow S. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 2003;71(6):3529-39.
 59. Merrell D, Thompson L, Kim C, Mitchell H, Tompkins L, Lee A, Falkow, S. Growth phase-dependent response of *Helicobacter pylori* to iron starvation. *Infect Immun.* 2003;71(11):6510-25.
 60. Lertsethtakarn P, Ottemann K, Hendrixson D. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:389-410.
 61. Lam W, Woo E, Kotaka M, Tam W, Leung Y, Ling T, Au S. Molecular interaction of flagellar export chaperone FlhS and cochaperone HP1076 in *Helicobacter pylori* Faseb J. 2010;24(10):4020-32.
 62. Allan E, Dorrell N, Foynes S, Anyim M, Wren B. Mutational analysis of genes encoding the early flagellar components of *Helicobacter pylori*: evidence for transcriptional regulation of flgellinA biosynthesis. *J. Bacteriol.* 2000;182, 5274-77.
 63. Zhang Z, Dorrell N, Wren B, Farthing M. *Helicobacter pylori* adherence to gastric epithelial cells: a role for non-adhesin virulence genes. *J Med Microbiol.* 2002;51(6):495-502.
 64. Wells D, Gaynor E. *Helicobacter pylori* initiates the stringent response upon nutrient and pH downshift. *J. Bacteriol.* 2006;188:3726-29.
 65. Mouery K, Rader B, Gaynor E, Guillemin K. The stringent response is required for *Helicobacter pylori* survival of stationary phase, exposure to acid and aerobic shock. *J.Bacteriol.* 2006;188(15):5494-5500.
 66. Zhou YN, Coleman WG Jr, Yang Z, Yang Y, Hodgson N, Chen F, et al. Regulation of cell growth during serum starvation and bacterial survival in macrophages by the bifunctional enzyme SpoT in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2008;190(24):8025-32.
 67. Thompson L, Merrell D, Neilan B, Mitchell H, Lee A, Falkow S. Gene expression profiling of *Helicobacter pylori*

- reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infect Immun*. 2003;71(5):2643-55.
68. Raudonikienė A, Zakharova N, Su W, Jeong J, Bryden L, Hoffman P, et al. *Helicobacter pylori* with separate beta- and beta'-subunits of RNA polymerase is viable and can colonize conventional mice. *MolMicrobiol*. 1999;32(1):131-38.
 69. Luthy L, Grutter MG, Mittl PR. The crystal structure of *Helicobacter pylori* cysteine-rich protein B reveals a novel fold for a penicillin-binding protein. *J Biol Chem*. 2002;277(12):10187-93.
 70. Truglio J, Croteau DL, Van Houten B, Kisker C. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chem Rev*. 2006;106(2):233-52.
 71. Moolenaar G, Monaco V, Van der Marel G, Van Boom J, Visse R, Goosen N. The effect of the DNA flanking the lesion on formation of the UvrBDNApreincision complex. Mechanism for the UvrA-mediated loading of UvrB onto a DNA damaged site. *J Biol Chem*. 2000;275:8038-43.
 72. Moccia C, Krebs J, Kulick S, Didelot X, Kraft C, Bahlawane C, Suerbaum S. The nucleotide excision repair (NER) system of *Helicobacter pylori*: role in mutation prevention and chromosomal import patterns after natural transformation. *BMC Microbiol*. 2012;12:67-9.
 73. Velayudhan J, Hughes N, McColm A, Bagshaw J, Clayton C, Andrews S, Kelly D. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *MolMicrobiol*. 2000;37(2):274-86.
 74. Wang G, Olczak A, Walton J, Maier R. Contribution of the *Helicobacter pylori* thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization. *Infect Immun*. 2005;73(1):378-84.
 75. Burns B, Hazell S, Mendz G. Acetyl-CoA carboxylase activity in *Helicobacter pylori* and the requirement of increased CO₂ for growth. *Microbiology*. 1995;141(12):3113-18.
 76. Bury-Moné S, Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H. The *Helicobacter pylori* UreI protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. *Mol Microbiol*. 2001;42(4):1021-34.