

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

“IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA QUE UNE HEMOGLOBINA SECRETADA POR *Streptococcus pneumoniae*”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

Zelene Edith Vázquez Zamorano

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

México D.F. a 20 septiembre del 2012

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

***“IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA QUE
UNE HEMOGLOBINA SECRETADA POR
Streptococcus pneumoniae”***

ESTUDIANTE

Q,A. Zelene Edith Vázquez Zamorano

TUTOR

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

ASESORES

DRA. MAVIL LÓPEZ CASAMICHANA

PROFESOR –INVESTIGADOR POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS, UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

DR. CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

PROFESOR –INVESTIGADOR POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS, UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

DRA. NORMA ANGÉLICA OVIEDO DE ANDA

INVESTIGADOR ASOCIADO “C” HOSPITAL CENTRO MÉDICO SIGLO XXI.

M. EN C. FERNANDO VARGAS ROMERO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por la educación que me brindó para alcanzar el grado de Maestría en Ciencias Genómicas y por el apoyo económico para la impresión del trabajo de tesis.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM por su confianza y nobles enseñanzas para la realización de mis estudios de posgrado.

Agradezco enormemente a CONACyT que a través del proyecto SALUD-2010-01-139945, se me otorgó apoyo económico y prestigio para la realización de la Maestría en Ciencias Genómicas.

*"Ex toto corde
amoris paravi meus"*

*"Para Bolli y
Comoro"*

Sep '12

1.0. INTRODUCCIÓN	6
1.1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA	6
1.1.1. Historia y Epidemiología	6
1.1.2. Características microscópicas de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
1.1.3. Factores de virulencia <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
1.1.4. Fisiología y condiciones para el crecimiento en medios de cultivo	14
1.1.5. Identificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	16
1.1.6. El Hierro para las bacterias	18
1.1.7. Estructura y propiedades del grupo Hemo	22
1.1.8. Adquisición de hierro en los microorganismos	23
1.2. ESTADO DEL ARTE	30
1.4. IMPORTANCIA DEL CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA	36
2.0 OBJETIVOS	38
3.0 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
4.0 MÉTODO	44
4.1. Cultivo de <i>S. pneumoniae</i> en agar sangre al 5%	44
4.1.2. Cultivo de <i>S. pneumoniae</i> en caldo Todd-Hewitt	46
4.2. Extracción proteínas totales de <i>S. pneumoniae</i>	48
4.2.1. Ultraconcentración de proteínas secretadas	48
4.2.2. Cuantificación de Proteína total con Bradford	49
4.2.3. Preparación de Geles de Acrilamida al 12%	50
4.2.4. Validación de integridad proteica con electroforesis SDS-PAGE al 12% acrilamida	53
4.2.5. Determinación de Rf para obtención de peso molecular	53
4.2.6. Cromatografía de Afinidad a Hemina	54
4.2.7. Inmovilización de Proteínas	56
4.2.8. Ensayo de Overlay	56
4.2.9. Ensayos de Unión a Hemoglobina	57
4.2.10. Ultraconcentración de proteínas para eliminación de exceso de clorhidrato de guanidina	57
4.2.11. Electroforesis de geles desnaturalizantes	58
4.2.12. Identificación de spots con espectrometría de masas.	59
5.0. RESULTADOS	60
5.1. Curva de crecimiento para <i>S. pneumoniae</i> R6	60
5.4. Ensayo de Overlay de Unión a Hemoglobina	73
5.5. Unión a hemoglobina en condiciones Nativas	75
5.6. Competencia con Hb, Hemina y Transferrina en gel de SDS-PAGE	79
5.7. Identidad de la proteína candidato a través de Espectrometría de Masas	81
Cobertura en la secuencia de la proteína: 27%	81
found: 1 hit in 1 sequence	83
6.0. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	85
7.0. CONCLUSIONES	94
REFERENCIAS	95

1.0. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1.1.1. Historia y Epidemiología

Streptococcus pneumoniae ha sido uno de los microorganismos más estudiado desde que fue aislado en 1881 por Pasteur en la saliva humana. El estudio sistemático de sus propiedades como agente de enfermedad humana ha conducido a los más importantes descubrimientos de la biología médica. Después de su descubrimiento fue establecida su relación con la neumonía. Más tarde, en 1910 el reconocimiento de los distintos tipos serológicos condujo a la obtención de antisueros específicos y, con ello, al primer tratamiento eficaz de la neumonía neumocócica. Siguió las observaciones de Avery, Heidelberger y Goebbel sobre la estructura química de los antígenos capsulares y su papel en la virulencia bacteriana. El descubrimiento de que los antígenos capsulares eran carbohidratos tuvo importantes efectos sobre la inmunología como ciencia, puesto que se pensaba que todas las sustancias inmunogénicas eran proteínas. En 1928, Griffith observó que las células de neumococo de un tipo serológico podían transformarse en células

neumocócicas de otro tipo *in vivo*. Más tarde, Avery, McLeod y McCarthy descubrieron que el constituyente químico de las células neumocócicas responsable de la transformación era su ADN. Otros importantes descubrimientos resultantes de la investigación en el neumococo fueron la eficacia terapéutica de la penicilina y el papel de la cápsula en la resistencia a la fagocitosis. (Luis A.C. "STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE RESISTENTE A CIPROFLOXACINO. ACTIVIDAD DE NUEVAS QUINOLONAS" 2001.)

En México *Streptococcus pneumoniae* tiene una gran relevancia en la salud pública ya que es responsable de una gran cantidad de infecciones respiratorias prevalentes de la comunidad: es el patógeno aislado con mayor frecuencia en infecciones focales, como otitis media aguda y sinusitis y el más frecuentemente relacionado con las infecciones invasivas en la infancia: se aísla en el 50% de las neumonías bacterianas y es el primer agente de las bacteriemias y de meningitis. (Arch Pediatr Urug 2004; 75(1): 91-103) Las infecciones invasivas por *S. pneumoniae* constituyen un serio problema de salud pública en países en desarrollo por las elevadas tasas de mortalidad que presentan. (Infecciones respiratorias agudas en las Américas. Bol Epidemiol OPS 1995; 16 (4):1-5.) Tan solo en el año 2010 se reportaron 234 casos de personas infectadas en México con *S. Pneumoniae* (Tabla 1 y 2) según el informe regional SIREVA II de ese año. En su mayoría Neumonía con 58.1%, en segundo lugar con 12,8% meningitis, en tercer lugar con 12.4% Bacteriemia, en cuarto lugar con 10.3% septicemia y 6.4% otras infecciones.

Grupos de edad	Fuente								Total	
	Hemocultivo		LCR		Líquido pleural		Otros*			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<12 meses	9	19,1	11	23,4	3	6,4	24	51,1	47	20,1
12 - 23 meses	8	21,1	3	7,9	11	28,9	16	42,1	38	16,2
24 - 59 meses	8	20,5	2	5,1	9	23,1	20	51,3	39	16,7
≥5 a 14 años	21	35,6	7	11,9	8	13,6	23	39,0	59	25,2
15 a 59 años	10	31,3	6	18,8	3	9,4	13	40,6	32	13,7
≥60 años	6	33,3	1	5,6	2	11,1	9	50,0	18	7,7
Sin dato**	1	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,4
Total	63	26,9	30	12,8	36	15,4	105	44,9	234	100,0

Tabla X. Número de aislamientos invasores por grupos de edad y por Fuente (Hemocultivo, Líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, otros)

Grupos de edad	Diagnóstico										Total	
	Neumonía		Meningitis		Sepsis		Bacteriemia		Otras*			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<12 meses	24	51,1	11	23,3	6	12,8	2	4,3	4	8,5	47	20,1
12 - 23 meses	27	71,1	3	7,9	1	2,6	3	7,9	4	10,5	38	16,2
24 - 59 meses	28	71,8	2	5,1	4	10,3	3	7,7	2	5,1	39	16,7
≥5 a 14 años	31	52,5	7	11,9	8	13,6	10	16,9	3	5,1	59	25,2
15 a 59 años	15	46,9	6	18,7	4	12,5	6	18,8	1	3,1	32	13,7
≥60 años	10	55,5	1	5,6	1	5,6	5	27,7	1	5,6	18	7,7
Sin dato**	1	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,4
Total	136	58,1	30	12,8	24	10,3	29	12,4	15	6,4	234	100,0

Tabla XI. Número de aislamientos invasores por grupos de edad y por diagnóstico

Así mismo la aparición de cepas resistentes a antibióticos, complica más el tema. Por lo que plantea nuevas situaciones que deben ser analizadas en función de ofrecer alternativas para el tratamiento y la prevención de este agente oportunista.

En cuanto a la forma en que el neumococo expresa la resistencia a los antibióticos, se ha precisado que se debe a alteraciones estructurales de la pared celular bacteriana. Así, se ha identificado que, cuando menos cuatro de

las cinco proteínas enlazadoras de antibióticos, sufren cambios dramáticos en su afinidad para unirse a las moléculas del antibiótico. Estas alteraciones son debidas a mutaciones genéticas. Hasta ahora no se ha demostrado que estén ligadas al aumento o a la disminución de la virulencia del *S. pneumoniae*. Un dato epidemiológico importante es que la presencia de CMI (concentración mínima inhibitoria) elevadas, es un marcador de la resistencia múltiple a diversas especies de antimicrobianos como el cloranfenicol, el trimetoprim-sulfametoxazol, la eritromicina, la tetraciclina y los aminoglucósidos. **(Velarde, 2010).**

1.1.2. Características microscópicas de *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, es una [bacteria Gram positiva](#) de 1,2-1,8 μm de longitud, que presenta una forma oval. Es inmóvil, no forma endosporas. Generalmente, se presenta en forma de diplococo (Ryan, 2004).

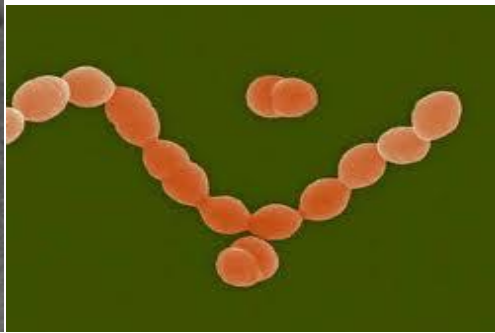
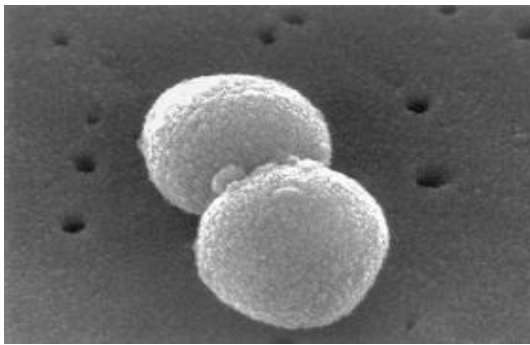


IMAGEN 1. Diplococo: www.wales.nhs.uk.

IMAGEN 2. Cadena de *Streptococcus*

pneumoniae: www.wales.nhs.uk.

1.1.3. Factores de virulencia *Streptococcus pneumoniae*

- **Adhesinas:** Son moléculas de superficie que han mostrado la función de adherirse a las células epiteliales del hospedero. Estas moléculas son necesarias para la colonización adjuntándose a la capa mucosa en interactuando con sus componentes como la mucina. Como resultado de esta interacción se produce el daño **(Davies y col. 1995)**.
- **Cápsula polisacárida:** La cápsula es una estructura externa a la pared celular, de naturaleza polisacárida. Es indispensable para la patogénesis de las infecciones neumocócicas. La composición de la cápsula es variable en diferentes cepas y permite agrupar a ***S. pneumoniae*** en más de 90 diferentes serotipos capsulares **(Van Damm, 1990)**.

La identificación de cada serotipo se realiza mediante una reacción antígeno-anticuerpo utilizando antisueros específicos, lo que da como resultado un agrandamiento de la cápsula. **(Prado, 2001)**. La cápsula es el factor de virulencia más importante, ya que las cepas capsuladas son capaces de eludir la acción fagocitaria en ausencia de anticuerpos específicos. También inhibe la activación del complemento por la vía alterna y degrada el fragmento C3b unido a la superficie bacteriana **(Prado, 2001)**.

- **Pneumolisina:** Son proteínas tóxicas, conocidas como toxinas formadora de poro (PLY), pueden lisar cualquier célula eucariota con colesterol en su membrana (**Benton y col. 1997**).

- **Pneuraminidasa:** Es una enzima capaz de hidrolizar las glucoproteínas y los glucolípidos celulares y por lo tanto ayuda a la diseminación y multiplicación de *S. pneumoniae* en los tejidos infectados. Disminuye la viscosidad del mucus que reviste el epitelio respiratorio y altera la estructura de los oligosacáridos, exponiendo los receptores y facilitando la colonización. (**Prado, 2001**).

- **Autolisina :** Denominada también amidasa, es una enzima que hidroliza la capa de peptidoglicano en un sitio específico entre el ácido N-acetil murámico y el residuo alanina del puente peptídico. (**Prado, 2001**).

- **Proteínas de superficie PspA y PspC :** PspA, es la proteína de superficie neumocal A, de unión a colina. Es expresada en todos los aislados clínicos de *S. pneumoniae* y ha sido considerada para el desarrollo de vacunas por sus cualidades inmunogénicas, interviniendo en la inactivación del complemento. (**Tu, 1999**). **PspC** también es una proteína de superficie de unión a colina. PspC se puede unir al factor H(FH), un regulador negativo de la ruta alternativa. Se considera que podría prevenir la actividad de la ruta alternativa contra *S. pneumoniae* (**Dave y col. 1994**).

- **Proteasa de la Inmunoglobulina A:** Degrada a la inmunoglobulina A1 (Benton y col. 1997).
- **Mecanismos de adquisición de hierro:** La habilidad de adquirir hierro en condiciones de baja disponibilidad de este, se encuentra relacionada con la virulencia en una gran cantidad de bacterias patógenas (Payne, 1988). Tal es el caso particular de la proteínas Pit1A y pit2A. (Brown, 2001).

1.1.4. Fisiología y condiciones para el crecimiento en medios de cultivo

Los medios de cultivo aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento de *S. pneumoniae* son medios que contienen agar soya tripticasa, agar infusión cerebro/corazón o **base de agar sangre**, los cuales deben contar con la adición de 5% de sangre de cordero. Carece de la enzima catalasa, necesaria para la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esta enzima debe ser aportada en forma exógena; en la práctica es proporcionada por la sangre. El crecimiento y desarrollo bacteriano se ve facilitado en un ambiente con 8 a 10% de CO₂. En los medios de cultivo antes señalados este microorganismo crece formando colonias redondas, mucosas y no pigmentadas, de 1 a 3 mm de diámetro, las cuales al cabo de 48 horas presentan un aspecto con una depresión central producida por una autólisis celular progresiva, *S. pneumoniae* tiene un tiempo de duplicación entre 20 y 30 minutos.

En los medios con sangre las colonias producen una hemólisis tipo alfa, es decir digestión parcial de la hemoglobina y la colonia se rodea de un halo verdoso (Prado, 2001).

La base de agar sangre: La base de agar sangre incluye infusión de músculo de corazón y peptona de caseína, estas proporcionan la fuente de nitrógeno, carbono, y aminoácidos. El extracto de levadura provee de vitaminas y de

aminoácidos esenciales para el microorganismo. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es usado como agente solidificante. Este medio está relativamente libre de azúcares reductores los cuales interfieren en las reacciones hemolíticas de estreptococos. El patrón de las reacciones hemolíticas puede variar dependiendo del tipo de sangre utilizada (**Todd-Hewitt, 1932**).



Figura 3. Sembrado masivo de *S. pneumoniae R6* en placa de base de agar sangre. (Vázquez Z. UACM. 2011).

1.1.5. Identificación de *Streptococcus pneumoniae*

La identificación de neumococo se lleva a cabo a través de las siguientes pruebas:

- **Su solubilización en presencia de sales biliares.**
- **Su sensibilidad a optoquina.**
- **La reacción capsular frente a antisueros específicos o "Quellung".**
- **Diagnóstico Molecular.**

Clásicamente la caracterización microbiológica ha sido confiada a diferentes métodos, principalmente en la morfología colonial, seguido de la selección de una colonia para su subsecuente selección, tipificación. En adición a esto la sensibilidad con optoquina y la solubilidad en presencia de sales biliares, con la aglutinación por anticuerpos contra los polisacáridos de la cápsula neumocal. Estos métodos convencionales permiten la identificación de la mayoría de los aislados, pero no dejan de mostrar dificultades tales como falsos positivos con *Streptococcus* relacionados (Waite y col. 2003).

En cuanto al diagnóstico molecular se incluye la prueba basada en la secuencia de DNA 16s ribosomal, o la digestión del gen amplificado 16s ribosomal; pruebas para la mayoría de las autolisinas neumocales; amplificación por PCR para los genes de autolisinas (*lyt A*) (Gillespies y col.)

1994), el gen de pneumolisina (*ply*), *psaA*, *pit2*, genes *pbp* (Rudolph y col. 1993). y el gen para Pep 27. Para desarrollar herramientas de diagnóstico

efectivo para pneumococcus, necesitamos entender más acerca de los microorganismos relacionados con ***S. pneumoniae***. (Waite y col. 2003).

1.1.6. El Hierro para las bacterias

El hierro se encuentra en dos estados de oxidación, Fe^{3+} (Férrico) o Fe^{2+} (Ferroso), este catión es esencial para todos los seres vivos debido a que es un cofactor de las proteínas hierro azufre que además funciona como agente reductor en reacciones de oxidación-reducción en la célula como es el caso de transporte de electrones, la atracción de oxígeno, la reducción de peróxidos, la síntesis de DNA, aminoácidos y nucleótidos **(Horton y col. 2002)**.

El exceso de hierro puede causar serias consecuencias a los organismos, tales como la formación de grupos reactivos OH^- , que dañan a los ácidos nucleicos, aminoácidos y ácidos grasos. Dado los efectos nocivos que produce el hierro, este no se encuentra en forma libre en el ser humano y necesita ser almacenado en proteínas especializadas denominadas metaloproteínas. Dentro de las metaloproteínas se encuentran algunas proteínas que en su estructura presentan al catión hierro unido de forma covalente sin la presencia de algún grupo prostético. Por otra parte, también dentro de las metaloproteínas existen proteínas de unión a hierro a través de un grupo prostético, como tal es el caso de las proteínas que contienen al grupo prostético Hemo; esto puede ser clasificado como aparece en la tabla 1 **(Martínez 2005)**.

Las principales funciones de las proteínas de unión a hierro con el grupo prostético hemo, transporte del hierro, brevemente las características de las proteínas con grupo hemo están descritas en la tabla 2.

METALOPROTEINAS	
PROTEINAS DE UNION A HIERRO SIN GRUPO PROSTÉTICO	PROTEINAS DE UNION A HIERRO CON GRUPO PROSTÉTICO HEMO
TRANSFERRINA LACTOFERRINA FERRITINA	Hemopexina Haptoglobina Albúmina Mioglobina Catalasa Citocromos Hemoglobina

Tabla 1 Clasificación de las metaloproteínas de origen fisiológico presentes en el ser humano (Gozález, 2008).

Como se muestra en la tabla 1 existe una variedad de proteínas en el ser humano con el grupo hemo en su estructura y cuyas características son resumidas en la tabla 2 (**González M; 2008**).

PROTEINA	kDa	LOCALIZACIÓN	FUNCION
Hemopexina	60	Suero	Une al grupo hemo
Haptoglobina	80-160	Suero	Une Hemoglobina libre
Albúmina	67	Suero	Acarrea grupos hemo
Mioglobina	17.8	Músculo	Transporte de oxígeno
Catalasa	244	Peroxisomas	Cataliza la descomposición de H_2O_2 en H_2O y O_2
Citocromos	Varía dependiendo del citocromo	Membrana citoplasmática mitocondrial	Transporte de moléculas energéticas
Hemoglobina	68	Eritrocitos	Transporta O_2 y CO_2

Tabla 2 Proteínas que unen al grupo hemo y función abreviada (González M; 2008).

1.1.7. Estructura y propiedades del grupo Hemo

El grupo hemo es un grupo prostético (grupo no proteico) que forma parte de diversas proteínas, contiene hierro y un anillo de porfirina; es un tetrapirrol cíclico, el tetrapirrol está compuesto por 4 cadenas de pirrol enlazadas a un anillo, en el centro de este anillo se encuentra el átomo de hierro. (Bohinski, 2000).

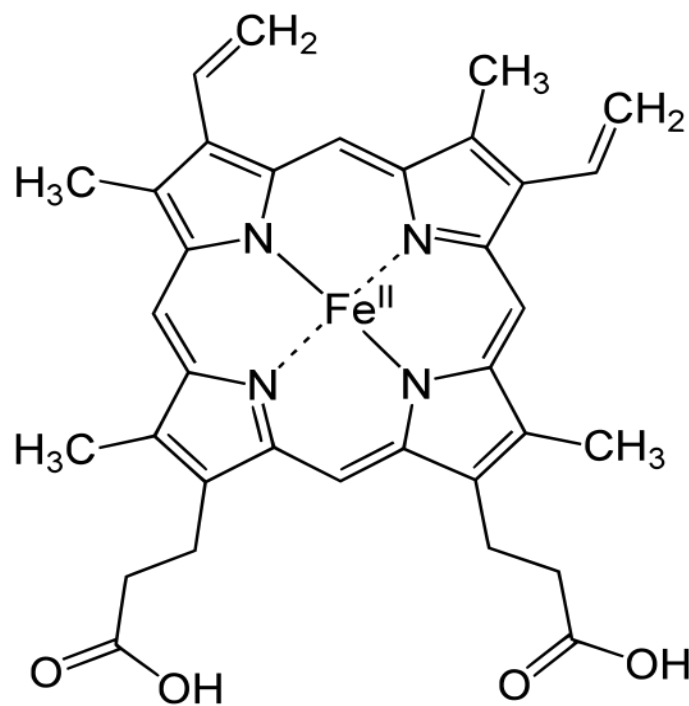


Figura 4. Esquematzación del grupo Hemo (Alberts y col, 1996)

1.1.8. Adquisición de hierro en los microorganismos

Las bacterias patógenas necesitan el hierro para llevar a cabo su proceso infeccioso **(Liu y col; 2006)**. Sin embargo el poco hierro libre que no ha sido almacenado por las proteínas resulta insuficiente para que las bacterias puedan sobrevivir **(Andrew y col; 2003)**. Por lo tanto las bacterias han desarrollado mecanismos para obtener hierro. Estos pueden ser indirectos, grupo al que pertenecen los sideróforos y los hemóforos; Consiste en la secreción de dichas moléculas captadoras de hierro o del grupo hemo, que posteriormente transportan al hierro o hemo hacia la célula bacteriana mediante el reconocimiento con receptores para sideróforos o para hemóforos. Por otra parte está el mecanismo directo, el cual solo consiste en el reconocimiento que realiza el receptor a la proteína portadora del hierro (Anzaldi y col 2010).

Por lo tanto la adquisición de hierro se realiza por medio de alguno de los siguientes mecanismos que se presentan en el siguiente diagrama y que se encuentra esquematizada en la figura 5.

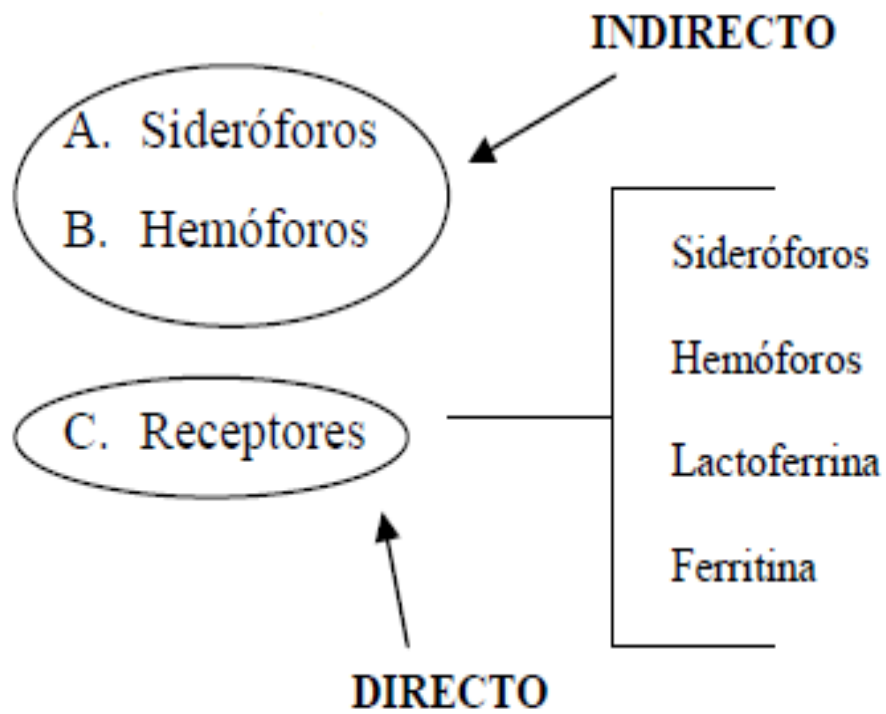


Figura 5: Mecanismos de adquisición de hierro (Anzaldi y Col. 2010).

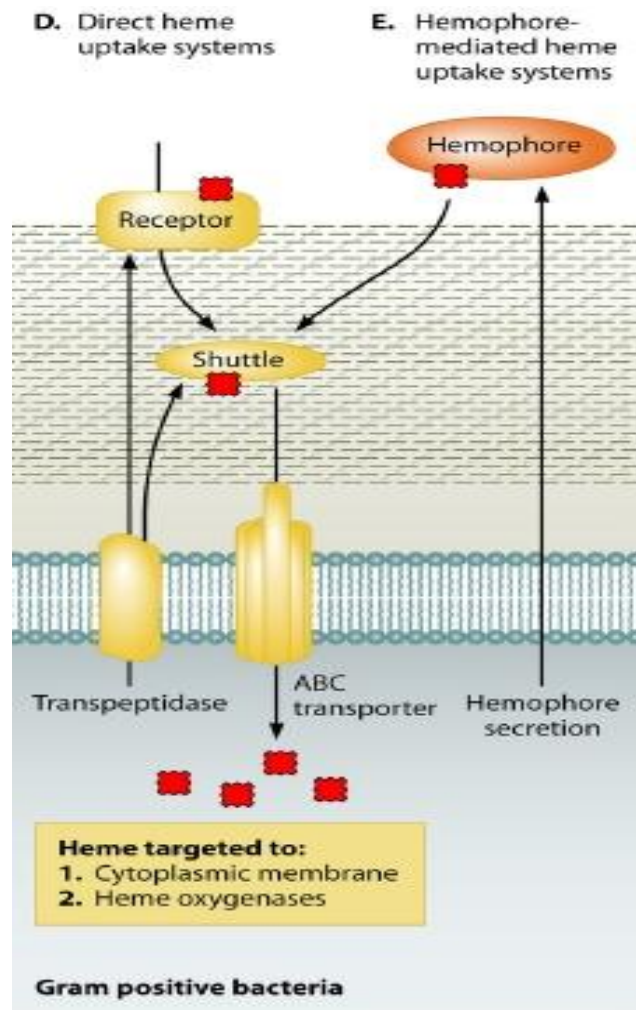


Figura 6: Mecanismos de adquisición de hierro (Anzaldi y Col. 2010).

A. Sideróforos: Son moléculas quelantes de hierro, tienen peso molecular menor a 1000 Da, poseen una constante de afinidad al Fe^{3+} de 10^{-30} M, son altamente electronegativos y unen preferentemente Fe^{3+} , los sideróforos son sintetizados en respuesta a la carencia de hierro **(Neilands, 1995).**

B.

C. Hemóforos: La mayoría de los reportes están dados en bacterias gram negativas, son secretadas al medio externo y capaces de unir al grupo hemo de diversas fuentes como Hb o hemopexina, tienen pesos moleculares aproximadamente de 10kDa- 30kDa en bacterias gram negativas. **(Andrews y col 2003).**

D. Receptores: Los receptores son lipoproteínas presentes en la membrana plasmática, a las que se unen específicamente otras sustancias químicas llamadas moléculas señalizadoras (Bohinski, 2000).

Centrando principal interés en el mecanismo indirecto que involucra específicamente a los hemóforos. En la figura número 6 se muestra una representación del mecanismo de adquisición de hierro a través de hemóforos tomando como modelo de estudio al microorganismo ***Bacillus anthracis***.

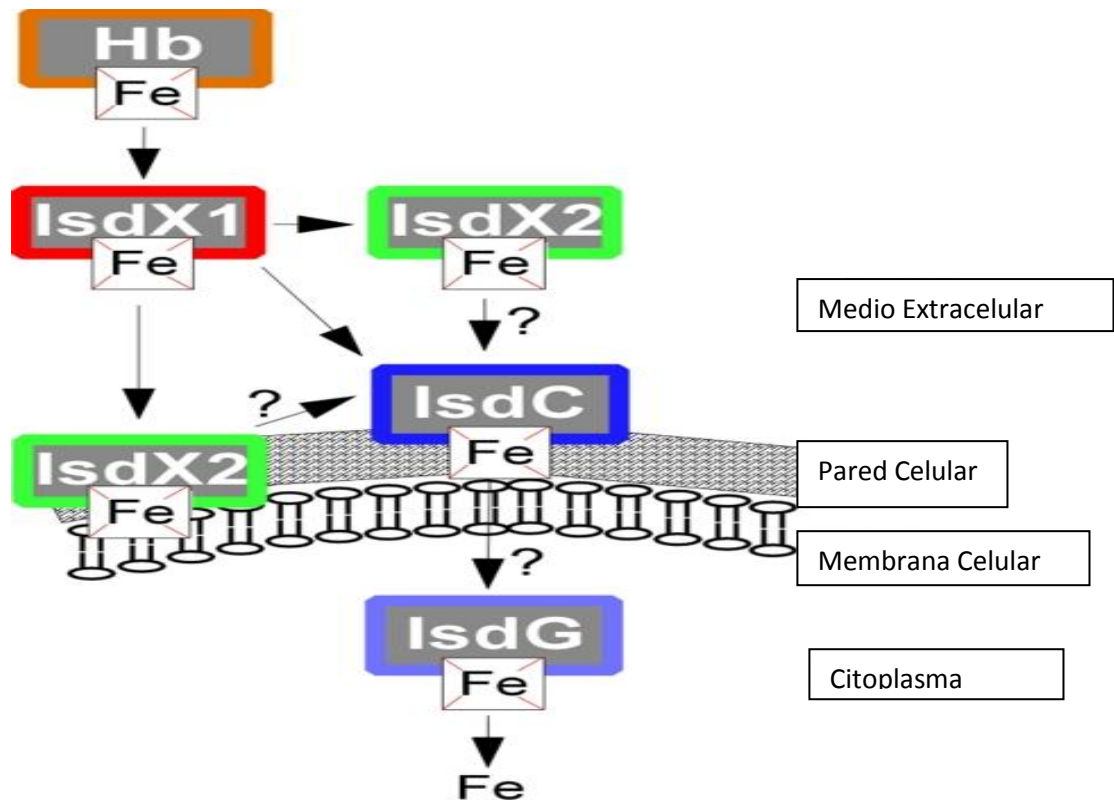


Figura 7: Mecanismo de adquisición de hierro a través de hemóforos en *Bacillus anthracis* (Marian 2009).

Se tiene reportado en algunas bacterias gram positivo adquieren el hierro del grupo hemo vía un módulo especializado en el transporte de hierro

denominado NEAR, cuyo nombre proviene del dominio transportador de hierro NEAT.

Por lo menos tres atributos distintivos y funcionales se han adjudicado a las proteínas NEAT:

1. **Unión del grupo hemo y de la hemoglobina.**
2. **Extracción del grupo hemo de la hemoglobina.**
3. **Transferencia del grupo hemo de dominio NEAT a dominio NEAT.**

Para ***B. anthracis***, se conoce que éste microorganismo secreta dos módulos proteicos NEAT, hacia el medio extracelular denominados IsdX1 e IsdX2, los cuales al parecer extraen al grupo hemo directamente de la Hemoglobina contribuyendo a su crecimiento, teniendo como única fuente de hierro a la hemoglobina. De hecho se tiene la hipótesis que estos hemóforos transportan al grupo hemo a una proteína anclada a la pared celular llamada IsdC, que se encarga de recibir al hemóforo permitiendo que la transferencia del grupo hemo se dé mediante el contacto entre IsdC e IsdX1 ó IsdX2.

Se propone que la ruta de adquisición y transporte del grupo hemo a través de hemóforos en ***B.anthraxis*** es de la siguiente manera: Se inicia con la secreción de Apo-IsdX1 hacia el tejido, sangre, extractos de hemo provenientes de hemoglobina libre. Una vez como Holo-IsdX1 esta interactúa con los bacilos en crecimiento a través de uniones físicas tipo NEAT-NEAT con la apo-IsdC, de manera que se facilita la transferencia del grupo hemo a la célula bacteriana.

Alternativamente, IsdX1 puede transferir el hemo hacia otra proteína secretada o asociada a la célula llamada IsdX2; Sin embargo, esta última ruta no se encuentra bien descrita. IsdC puede pasar el grupo hemo a un transportador ABC de la membrana (IsdE), que presenta homología con el de ***S. aureus***. Finalmente, IsdG recibe y degrada al grupo hemo en el citosol para liberar al hierro (**Fabian y col; 2009**).

1.2. ESTADO DEL ARTE

El hierro es un co-factor para una gran cantidad de enzimas y es conocido por regular la expresión génica en muchos patógenos. *S. pneumoniae* normalmente coloniza la mucosa del tracto nasofaríngeo el cual es un ambiente restringido en hierro. En contraste durante la bacteremia el hierro disponible en las proteínas hemo y no-hemo incrementa potencialmente debido a que la lisis de las células del hospedero permite la liberación del hierro almacenado en las proteínas de unión a hierro (**Benton, 1997**).

Se ha mostrado que en medios ausentes de hierro *S. pneumoniae* presenta crecimiento reducido. Sin embargo, la adición de diferentes fuentes fisiológicas de hierro restablecieron el crecimiento. En presencia de fuentes de hierro la expresión de hemolisinas y toxinas fue incrementada significativamente. **Estos hallazgos sugieren que la expresión de genes de virulencia en *S. pneumoniae* están diferencialmente regulados en respuesta a la cantidad y tipo de fuente de hierro disponible en el hospedero (Gupta y col; 2009).**

Se ha reportado que los pneumococcus utilizan sales férricas y ferrosas, hemoglobina y heminas como fuentes de hierro (**Brown y col. 2001**). Los Pneumococcus pueden unir hemina, también han sido identificadas proteínas hipotéticas de unión a hemina. Algunos sistemas de transporte ferrihidroximato

han sido detectados, tales pueden sustituir a los sideróforos, transportando ferricromo y ferrioxamina (**Pramanik y col. 2006**).

El microorganismo ***B. anthracis***; modelo de estudio de microorganismos gran positivo, secreta dos proteínas o hemóforos IsdX1 e IsdX2, que presentan dominios NEAT. Especialmente IsdX2 posee cinco dominios NEAT, implicando que esta proteína sea multifuncional, quizá desempeñe un rol como almacén durante el transporte del grupo hemo, y a su vez también presenta un rol que le permite estar asociado directamente sobre las proteínas de la pared celular (**Holger, 2009**).

1.3.ANTECEDENTES

PARTICULARES DEL TEMA

Uno de los retos que *S. pneumoniae* presenta al ser un microorganismo invasor de la mucosa nasofaríngea es la adquisición de hierro, mismo que es secuestrado por el hospedero y disponible en forma libre para el microorganismo en cantidades insuficientes para el crecimiento bacteriano. *S. pneumoniae* es reconocido por no secretar sideróforos, aunque varios ABC transporters, captadores de hierro se han identificado, como **Pit** (proveniente del operon *pit*; pneumocal iron transporter), **Piu** (proveniente del operon *piu*; pneumocal iron uptake) y **Pia** (proveniente del operon *pia*; pneumocal iron acquisition) (**Brown y col. 2001**), los cuales han mostrado ser necesarios para sobrevivir y crecer in vivo bajo condiciones escasas de hierro (**Brown y col; 2002**).

La habilidad de adquirir hierro bajo condiciones fisiológicas ha sido asociada con virulencia en una variedad de patógenos. La primera secuencia genómica del pneumococo reveló la presencia de transportadores ABC hipotéticos. Sin embargo, hasta el 2001 no se han encontrado genes que codifiquen para enzimas biosintéticas de sideróforos, hemóforos o de receptores de transferrina (**Tettelin y col; 2001**).

En el 2009 Ruiguang y col demostraron la presencia tanto del mecanismo directo como indirecto en la adquisición de hierro en *Streptococcus pneumoniae*, valido este último mecanismo del acoplamiento de sideróforos, tal y como se aprecia en la tabla 3

organism	transporter	function	substrate	reference
<i>S. pyogenes</i>	SiuADBG/Spy383-386	ABC transporter	heme	Smoot et al., 2001; Montanez et al., 2005
	Fhu/FtsABCD/Spy383-386	ABC transporter	siderophore	Hanks et al., 2005
	MtsABC	ABC transporter	Fe ²⁺	Janulczyk et al., 1999; Janulczyk et al., 2003; Sun et al., 2008
	SiaABC/HtsABC	ABC transporter	heme	Bates et al., 2003; Hanks et al., 2006; Sook et al., 2008
	Shr	heme receptor	heme	Zhu et al., 2008
	Shp	ABC transporter	heme	Lei et al., 2002; Liu and Lei, 2005; Nygaard et al., 2006; Aranda et al., 2007; Ran et al., 2007
<i>S. pneumoniae</i>	PiuBCDA	ABC transporter	heme	Brown et al., 2001; Tai et al., 2003
	Pia/Pit/FhuDBG	ABC transporter	siderophore	Brown et al., 2001; Brown et al., 2002; Pramanik and Braun, 2006
<i>S. equi</i>	EqbHIJ	ABC transporter	siderophore	Heather et al., 2008
<i>S. agalactiae</i>	MtsABC	ABC transporter	Fe ²⁺ /Mn ²⁺	Bray et al., 2009
	FhuCDBG	ABC transporter	siderophore	Clancy et al., 2006

ABC transporter: ATP-binding protein cassette transporter.

Tabla 3 Resumen de tipo de mecanismos de adquisición de hierro en especies de *Streptococcus*.

Se reveló en un estudio como el crecimiento de una cepa reconocida como virulenta de ***S. pneumoniae*** (TIGR4), fue soportado con la utilización de diferentes fuentes fisiológicas de hierro, así como la expresión de genes conocidos hipotéticos de virulencia en respuesta a las fuentes potenciales de hierro durante la colonización del tracto nasofaríngeo y bacteremia. **(Gupta y col. 2009).**

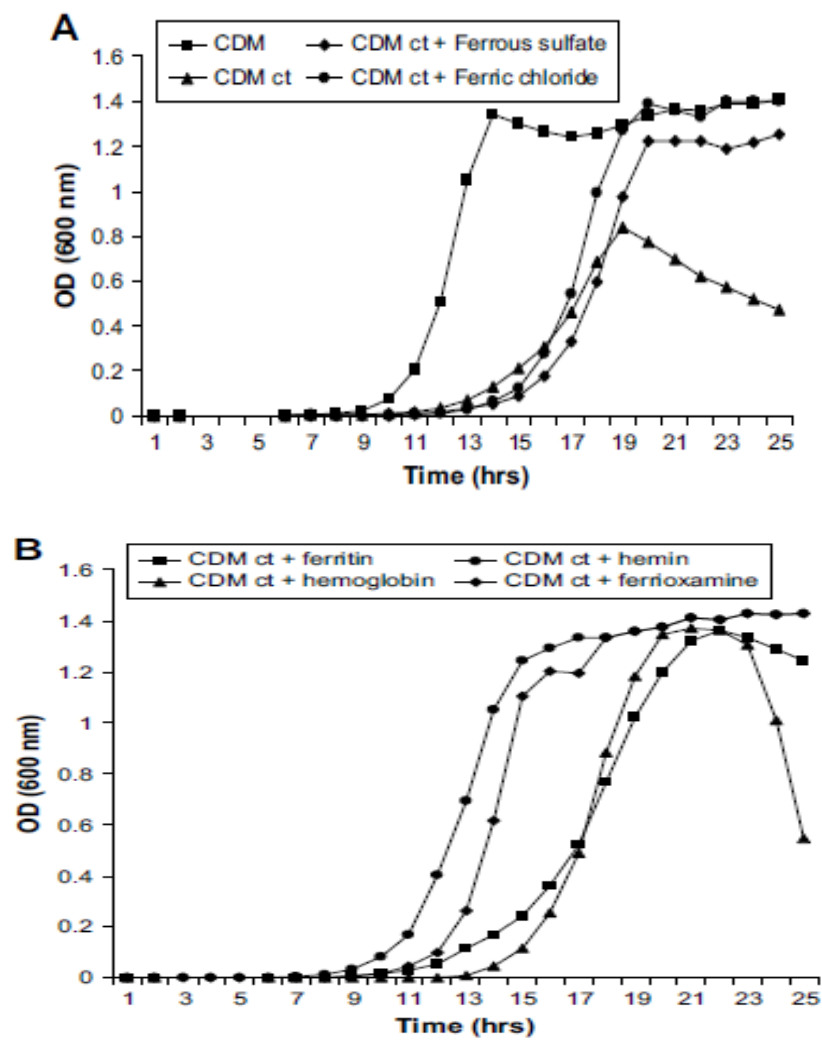


Fig 8. Crecimiento de la cepa TIGR4 neumocal en diferentes fuentes de hierro (Gupta R; et al. 2009).

1.4.IMPORTANCIA DEL CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA

La colonización es el paso inicial en la patogénesis de todas las enfermedades neumocales. Depende de la habilidad del neumococo de colonizar la mucosa del tracto nasofaríngeo sin inflamación aparente y por otra parte de causar enfermedad.

De tal modo que el paso entre colonización e infección está dado por la variedad de expresión y selección de proteínas de las células neumocales bajo diferentes condiciones. Por lo tanto es de considerar que la caracterización de las proteínas que son secretadas al medio por parte de *S. pneumoniae* puede proporcionar un conocimiento de los requerimientos moleculares específicos para la colonización y para la infección.

Dado que la adquisición de hierro para *S. pneumoniae* resulta ser un desafío, y por otro lado la evidencia de módulos proteicos con función secuestrante del grupo hemo como en *B. anthracis*; El entendimiento del mecanismo molecular de la importación de hierro provee concepto necesario y estructural para diseñar inhibidores que bloqueen dicho sistema durante la infección.

El presente trabajo se establece en la importancia de identificar en el medio exterior de *S. pneumoniae*, alguna proteína con actividad hemófora que sea secretada por dicho microorganismo. **Con el propósito de contribuir a la inferencia o argumento actual sobre el proceso infeccioso de este microorganismo en su hospedero.**

De forma resumida podemos establecer lo siguiente, como una justificación para el estudio de este tema.

“El grupo Hemo es una fuente disponible de hierro para la mayoría de las bacterias patógenas, por tal las proteínas de la maquinaria implicada en la adquisición de hierro son un blanco potencial para la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas”

HIPOTESIS:

S. pneumoniae posee un mecanismo indirecto para captar hemoglobina

2.0 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Investigar el mecanismo indirecto de adquisición de hierro teniendo como fuente a la hemoglobina en *S. pneumoniae*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Buscar proteína(s) secretada(s) por *S. pneumoniae* que puedan unir hemo.
- Identificar la(s) proteína(s) secretada(s) que une hemoglobina.

3.0 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental fue llevada a cabo en cuatro etapas, en alguna de ellas se esquematizan procesos esenciales para la ejecución de dicha etapa, con el propósito de que esta sea mejor ilustrada.

ETAPA #1

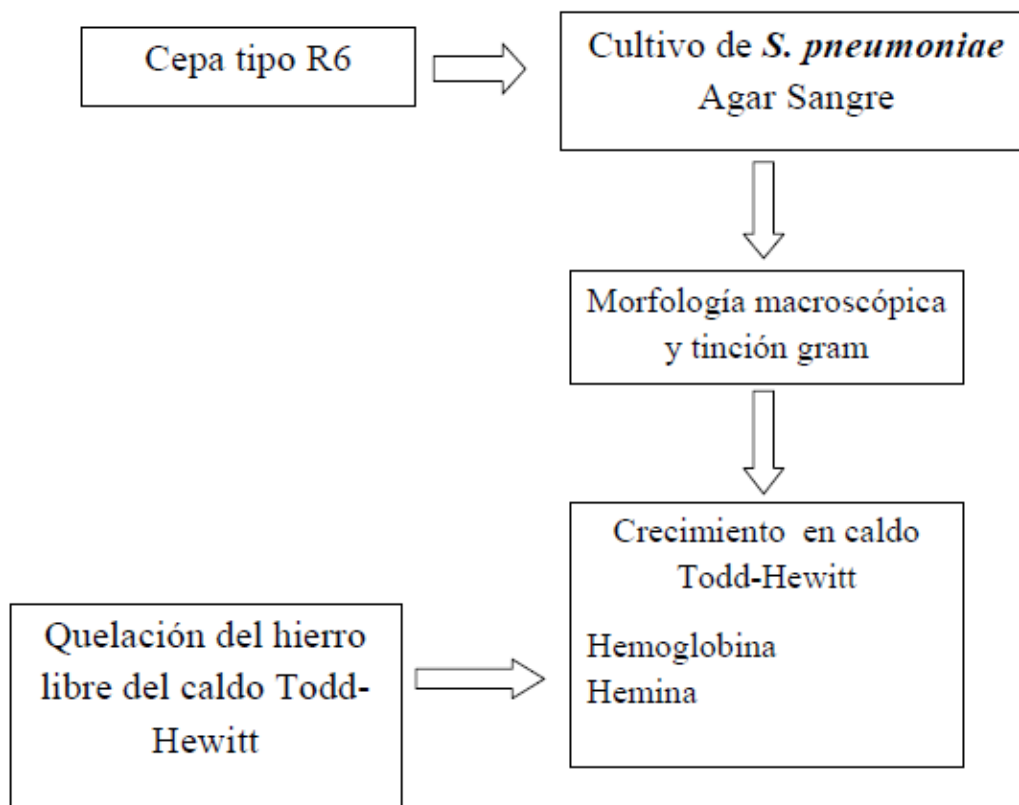


Diagrama 1 Obtención de cultivo celular

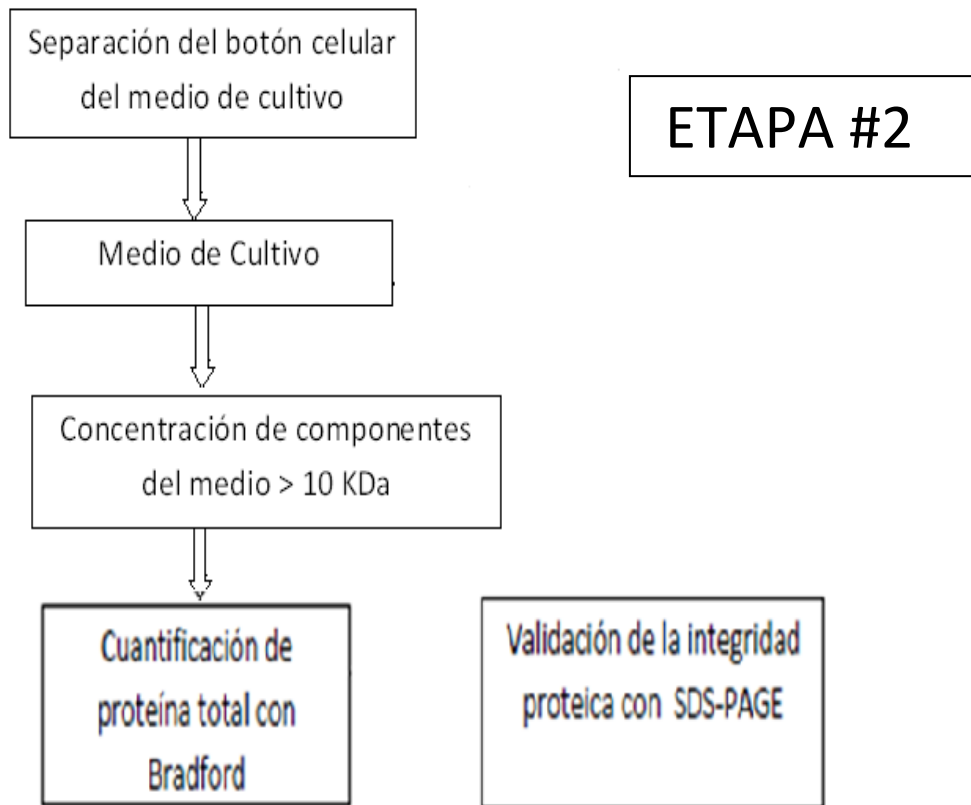
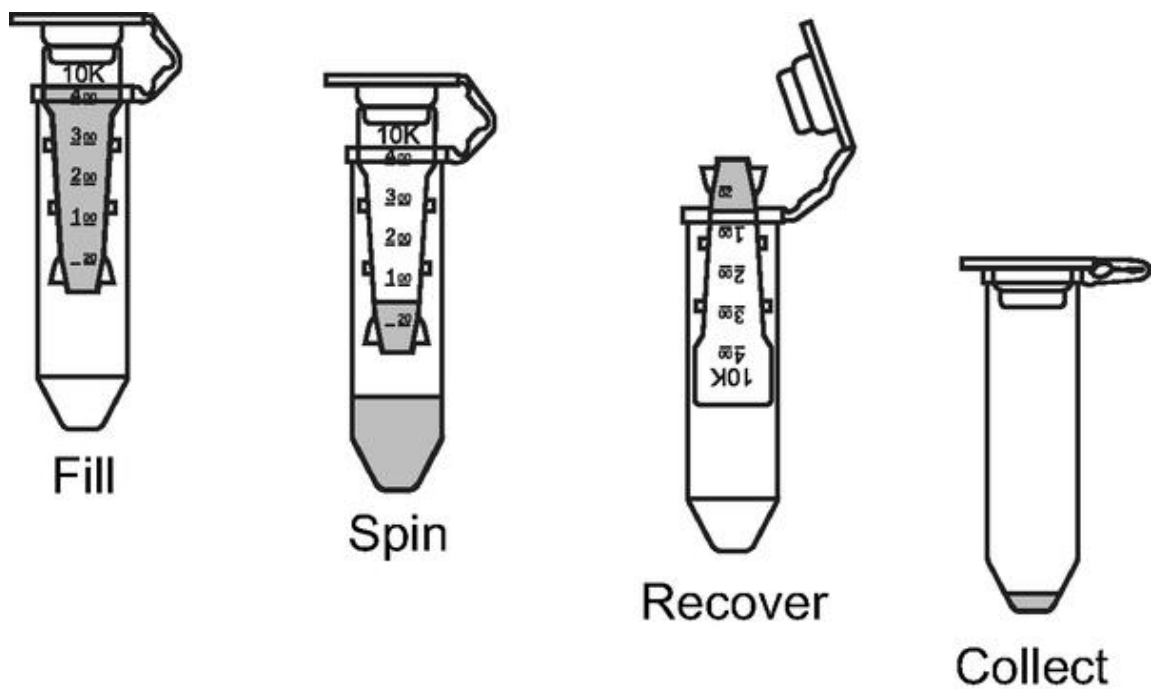


Diagrama 2. Obtención de proteínas totales secretadas



Esquema 1. Proceso de ultraconcentración

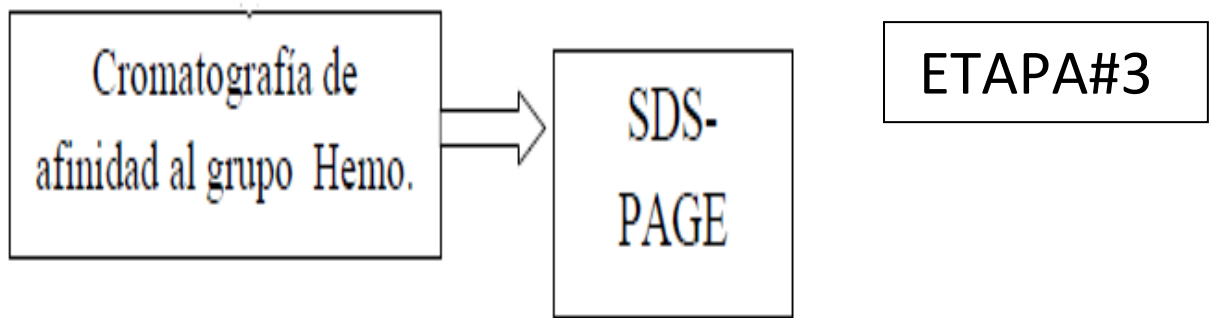
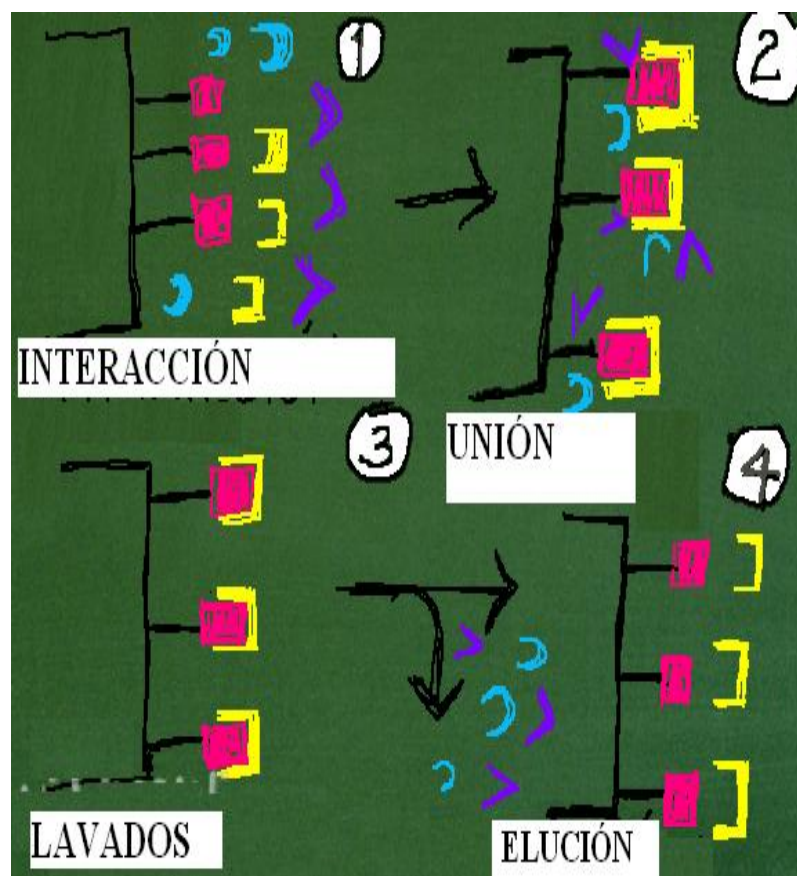


Diagrama 3. Obtención de proteínas secretadas afines a hemina.



Esquema 2. Proceso de cromatografía de afinidad

ETAPA#3

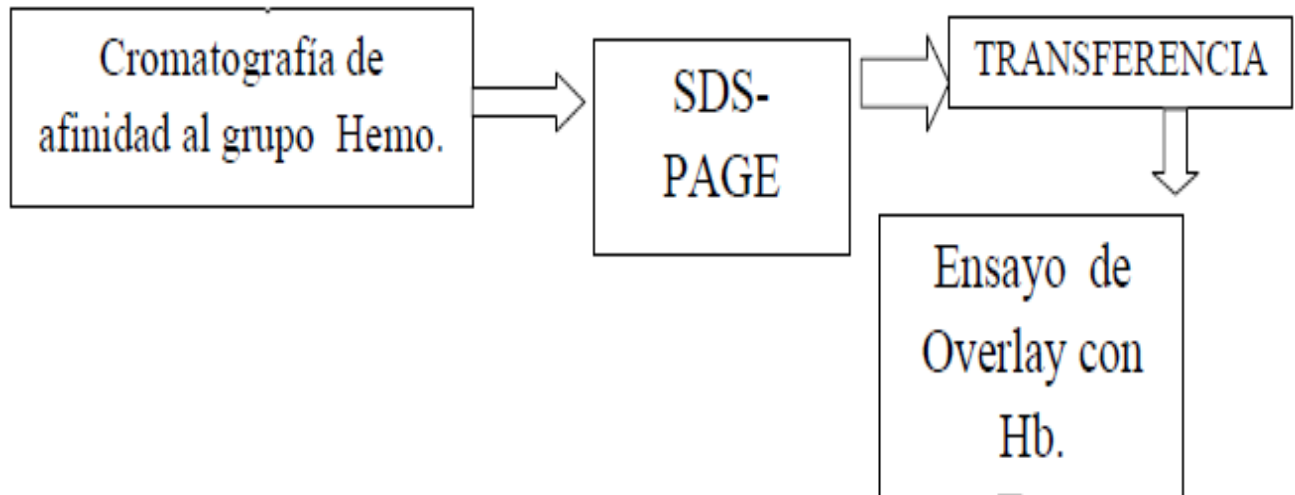


Diagrama 4. Ensayo de unión a hemoglobina

ETAPA #4

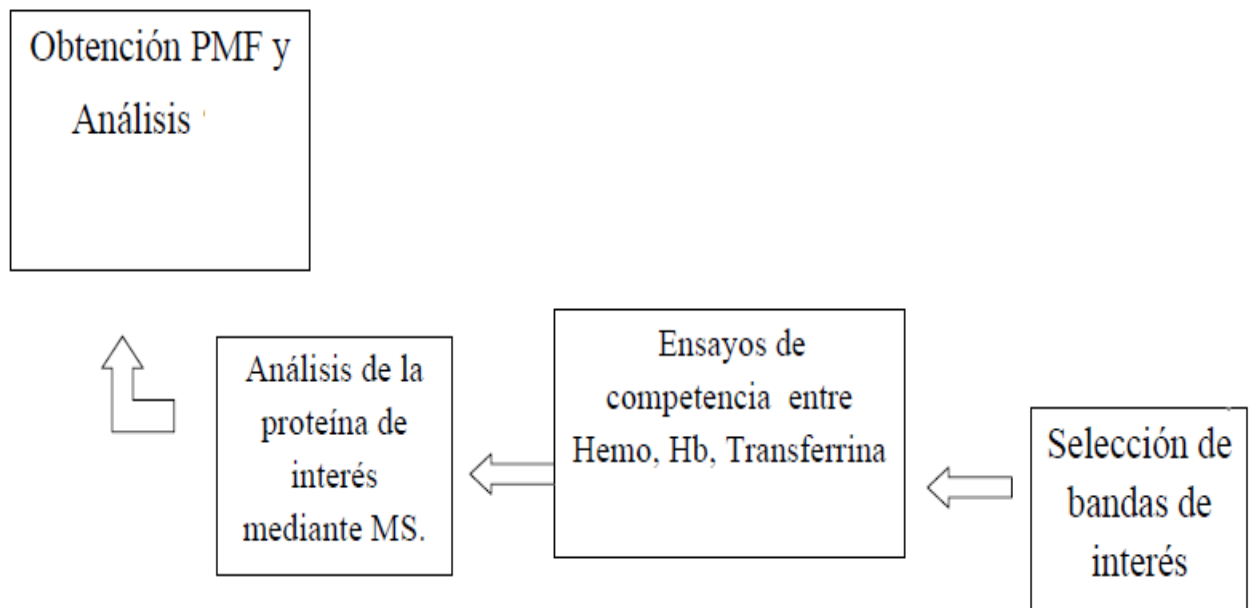


Diagrama 5. Obtención de la identidad de la proteína candidato (banda de interés), mediante Espectrometría de masas.

4.0 MÉTODO

4.1. Cultivo de *S. pneumoniae* en agar sangre al 5%

Para la preparación de 1L de Agar Sangre, se tomaron 40g de medio de cultivo Base de Agar Sangre (Dibico ®) en un matraz erlenmeyer de 2L y disolvieron en un volumen de 1L de agua hasta ebullición.

Se esterilizó en autoclave a 121° C por 15 minutos. Una vez esterilizado el medio se esperó a que este disminuyera su temperatura hasta que se pudiera sostener por la base sin quemarse. En ese momento se agregaron 50 mL de sangre de cordero desfibrinada (Dubico ®). El medio se vertió en cajas petri con diámetro de 10 cm. Reposar las cajas en la incubadora Thermo Scientific LX a 37°C para prueba de esterilidad durante 24 hrs.

4.1.1. Sembrado de *S. pneumoniae* R6 y cepas resistentes en placa de agar sangre

La bacteria *S. pneumoniae* tipo R6 son recuperados a partir de un congelado en glicerol, presente en un criotubo.

Después se realizó la siembra de *S. pneumoniae* mediante la técnica de estría cruzada, según el esquema 1 con el propósito de aislar colonias y validar la presencia del microorganismo con morfología colonial y microscópica con tinción Gram, en el Microscopio de luz LeicaDME®.

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

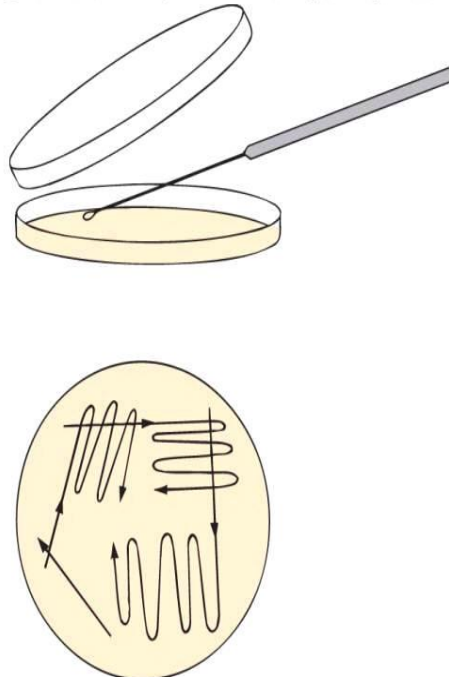


Figura9. McGraw-Hill 2009

4.1.2. Cultivo de *S. pneumoniae* en caldo Todd-Hewitt

Se disolvieron 30g de medio Todd-Hewitt marca Dibico® y 5g de extracto de levadura marca Dibico ® en un litro de agua calentando hasta ebullición, esterilizar a 121°C durante 15 min.

Generación de Overnight; fueron Inoculados 20mL de medio líquido Todd-Hewitt con una caja petri entera que presente un cultivo de 24hrs de crecimiento de *S. pneumoniae*. Se incubó en el equipo Thermo Scientific 184 - 8212 a 37°C y 10% de CO₂ durante 24 hrs, esperando obtener una D.O. de 0.3.

Fue tomado el volumen necesario del overnight para ajustar a una D.O. de 0.1 y centrifugar a 5000 rpm en el equipo Beckman Coulter Allegra X-22R Centrifuge por 5 minutos, posteriormente se eliminó el medio y se adicionó medio líquido Todd-Hewitt fresco para ajustar a una D.O. de 0.1; e iniciar el monitoreo del crecimiento espectrofotométricamente con el equipo Thermo Electron Biomate3 a una $\lambda = 600\text{nm}$ cada hora.

Nota: Para la quelación o eliminación del hierro libre del medio Todd-Hewitt, debe ser adicionado con 2,2, dipiridil, (Sigma®), a una concentración 700uM.

Este medio será utilizado para probar otras fuentes de hierro como:
Hemoglobina, Holotransferrina, FeCl_3 y Hemina (Sigma®).

4.2. Extracción proteínas totales de *S. pneumoniae*

Una vez alcanzado una D.O. de 0.8 en el cultivo celular, este se centrifugó a 5000 rpm 10 minutos. Se eliminó el medio y se realizaron dos lavados al botón con PBS (Phosphate Buffered Saline), posteriormente se adicionó PMSF (Fenil metil sulfonil fluoruro) como inhibidor de proteasas a una concentración de 1mM. Se resuspendió el botón en PBS, seguido de una sonicación en el equipo Ultrasonic Processor GEx130, 3 minutos con amplitud del 80% y lapsos de 20x20.

4.2.1. Ultraconcentración de proteínas secretadas

Del mismo cultivo que resultó ser empleado para la extracción de proteínas totales, se utilizó para la obtención de proteínas secretadas, para someterlas a ultraconcentración, procediendo de la siguiente manera: Una vez alcanzado la D.O. de 0.8 en el cultivo celular este centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, se separó el botón celular y se conservó el medio líquido de cultivo a 4°C, vertiéndolo en centricones Amicon-15 Ultra, de Millipore® con capacidad de 15 mL y punto de corte de 10 KDa, con el propósito de concentrar 10 veces el volumen original,

bajo el proceso de centrifugación a 7500 rpm durante 25 min., en el Beckman Coulter Allegra X-22R Centrifuge .

Por tal de un volumen original de 25 mL de medio de cultivo con proteínas secretadas, se obtuvieron 2.5 mL, a los cuales se les adicionó PMSF a una concentración final de 1Mm.

Posteriormente se procedió a la cuantificación de proteína total con Bradford para detectar la dilución apropiada para una concentración de 2.5ug/uL para su empleo posterior en el proceso de cromatografía de afinidad.

4.2.2. Cuantificación de Proteína total con Bradford

La proteína se cuantifica, mediante el método de Bradford, usando una curva patrón construida con las concentraciones de albúmina indicadas en la tabla 5. La detección de la Absorbancia se realizará en un lector de ELISA ELx800 a una $\lambda = 590\text{nm}$.

Construir curva estándar para la cuantificación de proteína, la cual se encuentra constituida de la siguiente manera empleando como proteína de referencia Albúmina (Sigma ®), obtenida de una disolución stock a una concentración de 5mg/mL. Ensayo de Bradford (BioRad Hercules, CA, USA)

Albúmina	Agua	Bradford
2.5uL	397.5uL	100uL
5uL	395uL	100uL
10uL	390uL	100uL
15uL	385uL	100uL
20uL	380uL	100uL
25uL	375uL	100uL

Tabla 5: Curva patrón de albúmina.

BLANCO
250uL Agua + 250uL Bradford
Muestra
2.5uL muestra + 397.5uL Agua + 100 Bradford

Leer en el lector de ELISA ELx800 a 590 nm empleado el programa KC Junior®.

4.2.3. Preparación de Geles de Acrilamida al 12%

De acuerdo con la tabla 6 se muestran las cantidades empleadas para obtención de un gel de 8.0X7.3 cm al 12% de acrilamida

	Gel Separador	Gel Espaciador
ddH ₂ O	3.2 ml	6.1 ml
Buffer	2.5 ml (pH 8.8)	1.5 ml (pH 6.8)
SDS 10%	100 µl	100 µl
Acrilamida (neurotóxica usar guantes)	4.2 ml	1.3 ml
TEMED	5 µl	10 µl
Persulfato de amonio*	50 µl *	50 µl*

Tabla 6: Cantidades utilizadas de cada reactivo para la realización de geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 12%

A) PREPARACIÓN DE GELES

1. En dos tubos diferentes se mezclaron los reactivos para la preparación del gel separador y de concentración (espaciador), según las cantidades antes descritas con excepción del persulfato de amonio, que se agregó en el momento antes de verter la mezcla los geles.

 2. Eliminar el aire de la mezcla mediante creación de vacío (el aire inhibe la
 3. reacción de polimerización) por 15 minutos y a temperatura ambiente.
- Ensamblar el molde para el gel utilizando vidrios de 1.00 mm de espesor.
-
4. Agregar a la mezcla correspondiente para el gel separador, 50 µl de persulfato de amonio. Con una pipeta para 10 ml, colocada en una de las esquinas superiores de los vidrios del molde para el gel, añadir un total de 3.5 ml de esta mezcla al molde. Inmediatamente agregar 200 µl de isopropanol sobre el gel para evitar el contacto con el aire. Esta mezcla gelifica aproximadamente en 30 a 45 minutos.

5. Una vez que gelificó la mezcla correspondiente al gel separador, se descarta el isopropanol inclinando el molde ensamblado. Luego de esto se le agrega al buffer espaciador 50 µl de persulfato de amonio. Se chorrea de la misma manera que el buffer separador. La cantidad necesaria es aquella que se añade hasta que se rebalse del espacio entre los vidrios. Se coloca inmediatamente el peine para 0.75 mm. Esta mezcla gelifica aproximadamente en 30

B) PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Una vez seleccionada la dilución para contar con una concentración total de proteína de 2.5ug/uL, a dicha alícuota se le agregó buffer de carga o buffer Laemmli 4x en una proporción de 1x para el buffer de carga, seguido de un tratamiento térmico de la muestra a temperatura de ebullición durante 6 minutos. Después se enfrió la muestra en hielo para detener la actividad del buffer de carga, y así poder almacenar

A continuación se muestra la formulación para el buffer de carga 4x

- 2.4 ml 1 M Tris pH 6.8
- 0.8 g SDS stock
- 4 ml 100% glicerina
- 0.01% Azul de bromofenol

- 1 ml β -mercaptoetanol grado biología molecular
- 2.8 ml dd

4.2.4. Validación de integridad proteica con electroforesis SDS-PAGE al 12% acrilamida

Las muestras de proteína fueron separadas en función de su peso molecular aplicando 120 volts. Después de 1.5 hrs. se tiñeron los geles con azul de coomasie (10% de ac. acético, 40% de etanol y 0.05% de Coomasie azul brillante) durante 30 min, para decolorar los geles se destiñeron con una solución decolorante (30% de metanol, 40% de ácido acético en agua desionizada) durante 1 hora.

4.2.5. Determinación de Rf para obtención de peso molecular

El SDS-PAGE se usó, para determinar el peso molecular de proteínas. Para ello se comparó el Rf de la proteína problema con el de proteínas de referencia

cuyo peso molecular se conoce. El Rf es el parámetro experimental asociado a esta

técnica, y se define como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

El frente del gel se determina por la posición de un compuesto de referencia de movilidad máxima, como puede ser el colorante azul de bromofenol.

Una vez que se contó con el Rf de las proteínas de referencia (proteínas del marcador se procedió a la construcción de una línea recta donde se cuenta en con el eje “X” con la distancia migrada en mm y en el eje “Y” con el log P.M. Para que a través de la ecuación de la recta se obtuviera por interpolación el P.M. de las proteínas en estudio.

4.2.6. Cromatografía de Afinidad a Hemina

Se tomaron 100 uL del extracto total ultraconcentrado de proteínas secretadas de *S. pneumoniae*, a una concentración de 2.5 ug/uL para someterlos a una

interacción bajo agitación máxima en el equipo Thermo Scientific modelo 9382 a 4°C durante 12 horas con 100uL de perlas de Hemin-Agarosa Tipo I Sigma-Aldrich®.

Al transcurrir dicho tiempo se sometió la mezcla perlas-proteína secretadas a una centrifugación a 4000 rpm durante 1 min. en el equipo Beckman Coulter Allegra X-22R Centrifug a 4°C, se recolectó el sobrenadante, y se le denominó como flow-trough, seguido se adicionaron 100uL de una disolución 500 mM de NaCl, y se sometió a centrifugación a 4000 rpm también a 4°C durante 10 min, este paso fue realizado por triplicado y cada una de las fracciones del sobrenadante se le denominó Lavado, L1, L2 y L3 de manera subsecuente.

Finalmente a las perlas de Hemin-Agarosa se le adicionaron 100uL de una disolución 6M de Clorhidrato de Guanidina, y nuevamente se llevo a centrifugación a 4000 rpm 30 min. a 4°C, este paso se realizó por triplicado y cada una de las fracciones del sobrenadante se le denominó Elución, E1,E2 y E3 subsecuentemente.

Para visualizar el proceso de cromatografía, de cada una de las fracciones mencionadas se tomaron 25uL y se cargaron en diferentes carriles de un gel al 12% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

4.2.7. Inmovilización de Proteínas

Se transfirieron las proteínas perteneciente al proceso de cromatografía a una membrana de nitrocelulosa a través de una corriente eléctrica, haciendo uso del equipo de transferencia en semiseco Trans Blot SD-Semy Dry Transfer Cell Biorad®, en el siguiente orden: Papel filtro, membrana de nitrocelulosa, gel de acrilamida con las proteínas separadas y por último papel filtro. Se debe humedecer con buffer de transferencia y eliminar burbujas de aire entre el gel y la membrana de nitrocelulosa. Correr a 15 V durante 20 minutos.

4.2.8. Ensayo de Overlay

Una vez realizada la transferencia, se lavó la membrana con PBS (tween al 0.05%) 3 veces durante 15 minutos cada ciclo de lavado, se bloqueó con leche al 5% por una hora y se realizaron 3 lavados con PBS. Después se incubó con 5ug/mL de Hemoglobina humana durante 12 horas a 4°C, se lavó la membrana

3 veces con PBS, y se incubó con el anticuerpo primario (anti-globina) a una dilución 1:10000, se lavó la membrana con PBS 3 ciclos, y por último se incubó con el anticuerpo secundario (anti-anti-globina) 1:10000, nuevamente se lavó con PBS durante 3 ciclos y por último revelar con el kit de luminiscencia de Millipore®.

4.2.9. Ensayos de Unión a Hemoglobina

Para analizar si la proteína en estudio tiene actividad hemófora es necesario conocer si unen el grupo hemo, La capacidad de unir hemo fue analizada mediante ensayos de unión en condiciones nativas que consisten en: poner a Interaccionar 20 uM de hemo y de la proteína de estudio, a una temperatura de 37°C durante 30 min. en buffer de unión (Tris 250 Mm, EDTA 5 Mm, Glicerol 10% , pH de 6.8) Transcurrido el tiempo de incubación las proteínas se resolvieron en dos geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 7%. Uno de los geles fue revelado con peróxido de hidrógeno al 3.5% (evidenciando el grupo hemo) mientras el segundo gel fue teñido con coomasie para evidenciar la posición de la proteína en estudio, del complejo de unión y de la hemoglobina.

4.2.10.Ultraconcentración de proteínas para eliminación de exceso de clorhidrato de guanidina

Las fracciones provenientes de la cromatografía de afinidad fueron sometidas a ultraconcentración en centricones de la marca Millipore ® de 0.5mL con punto de corte de 3 KDa, a 7500 rpm durante 5 minutos.

4.2.11. Electroforesis de geles desnaturalizantes

Para separar las proteínas en base a su forma nativa y observar la posible formación de complejos se realizó una electroforesis en gel de PAGE no desnaturalizante. La separación en una matriz de poliacrilamida se realizó en el sistema de electroforesis Miniprotean (Biorad®) aplicando una corriente eléctrica de 80 volts utilizando como buffer de corrimiento TBE (Tris borato 45 mM y EDTA 1mM). Los geles nativos contenían un 7% de acrilamida y se preparan con las siguientes soluciones:

- Acrilamida/Bisacrilamida (30%) 3.30
- TBE 5x 2mL
- Persulfato de amonio 10%
- TEMED 0.1% 10 uL
- Agua dd 1.27 mL

Para evidenciar la presencia del grupo, los geles nativos fueron revelados utilizando peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich ®) el cual fue diluído a una concentración final de 3.5%, para esto fue necesario el uso de agua desionizada, Los geles fueron incubados durante 2 min en el peróxido con agitación muy lenta e inmediatamente fotodocumentados.

4.2.12. Identificación de spots con espectrometría de masas.

Después de la selección de los spots de interés, extirparlos de los geles 2D teñidos y someterlos a una digestión con tripsina (Promega,®), para su posterior análisis con el Cromatógrafo de Líquidos, LC (Agilent 1200®), acoplado al Espectro de Masas MS (Applied Biosystem® QTRAP 3200). La separación y análisis de los péptidos digeridos debe ser llevada a cabo usando una trampa de 0.075mm(di) x 20 mm(largo) y una columna empacada con TCA C18 de 0.075mm (di)X 130mm (largo) y colocada en línea para que los péptidos sean preconcentrados en la trampa usando 5% v/v de Aceto Nitrilo(ACN) en 0.1% v/v de ácido fórmico. Para el gradiente de elución debe ser de 5-80% ACN en 0.5% v/v por 50 min con un flujo de 0.15uL/min. El eluyente de la columna capilar de la columna capilar debe ser dispersada (efecto spray) dentro de la trampa de iones (IT) del espectrómetro. Los datos deben ser colectados en modo centroid usando “triple play”: “full mass scan” en un rango de 395-2000Da (m/z), la determinación de los estados de carga de un ion en zoom scan, con una energía de colisión del 55%. Por último analizar los datos haciendo una correlación de ellos con la base de datos MSDB, OWL o NCBI, sugiriendo utilizar el programa de búsqueda MASCOT. (www.matrixscience.com).

5.0. RESULTADOS

Cada uno de los ensayos fue realizado por triplicado, por lo que respecta a la obtención de valores numéricos estos representan el promedio del triplicado.

A excepción de la sección 7.5. cuyas imágenes son únicas y representativa de un solo experimento.

5.1. Curva de crecimiento para *S. pneumoniae* R6

El presente experimento fue realizado con el propósito de evidenciar indirectamente el uso de las fuentes fisiológicas de hierro, que tuvo *S. pneumoniae* R6 a su disposición para su crecimiento.

Para tal efecto se construyó un gráfico o curva de crecimiento del mismo experimento realizado por triplicado (Figura 7).

que representa el monitoreo del crecimiento del cultivo hora tras hora en un intervalo de tiempo total a siete horas, y medido a través de la D.O. a una $\lambda = 600\text{nm}$, considerando un incremento en la absorbancia o turbidez como un incremento en la población celular de *S. pneumoniae* R6

La figura 7, nos presenta el comportamiento de R6 en cuanto su crecimiento bajo tres fuentes exclusivas y diferentes de hierro, hemina hemoglobina y cloruro de hierro III (FeCl_3), una condición basal control positivo (T-H) y una condición control negativa o simplemente depletada de hierro (Dipiridil).

Si bien, como es de observarse, bajo las distintas condiciones se presentó una fase lag o de adaptación, aproximadamente de tres horas, presente en las curvas de crecimiento convencionales. Después de dicho tiempo transcurrido para la condición basal se obtuvo un máximo de crecimiento de 0.78 unidades de absorbancia hasta la séptima hora.

Para la hora siete, con respecto a las tres condiciones de prueba (hemoglobina, hemina y FeCl_3), la condición de FeCl_3 consiguió el mayor crecimiento para el microorganismo comparado con el resto de las condiciones con una $A = 0.97$, seguida de la condición con hemoglobina con 0.82 unidades de Absorbancia y para el caso particular de la condición de hemina se consiguió un máximo de 0.62 de Absorbancia en el mismo horario.

Por último para la condición depletada de hierro después de la hora tres se observa un decremento considerable en el crecimiento o la Absorbancia entre la hora 3 y 4, llegando a un valor mínimo de 0.02 A, para la hora siete, confirmando de esta manera la efectividad del quelante 2,2 Dipiridil.

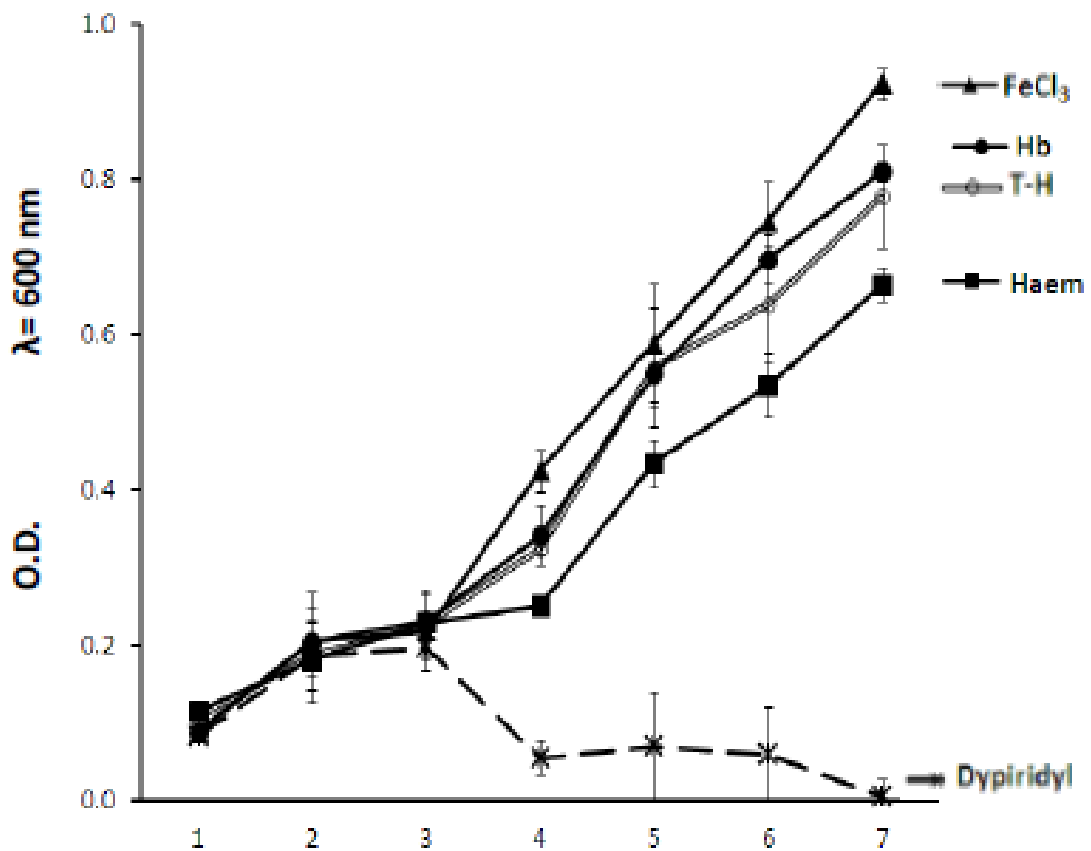


Figura 9

Comparación del crecimiento de *S. pneumoniae* R6 con tres fuentes diferentes de hierro.

Curvas de crecimiento de 7 horas para la cepa R6 con cinco diferentes condiciones. standard T-H, depletada de hierro haciendo uso del 2,2 dipiridil, condición suplementada con 10uM de hemoglobina, condición suplementada

con 10uM de hemina y condición suplementada con 10uMde FeCl_3 . El crecimiento bajo la condición con el 2,2 dipiridil fue pobre tendiente a cero. Y como era de esperarse se presentó crecimiento a nivel exponencial para el resto de las condiciones.

5.2. SDS-PAGE de las proteína secretadas totales en diferentes condiciones

El SDS-PAGE, de la figura 8 demuestra el perfil de las proteínas totales secretadas al medio por el microorganismo *S. pneumoniae* bajo diferentes condiciones (1) Medio TH condición basal, (2) Medio TH, condición depletada de hierro, (3) Medio TH, depletado de hierro suplementado con hemina, (4) Medio TH, depletado de hierro suplementado con hemoglobina.

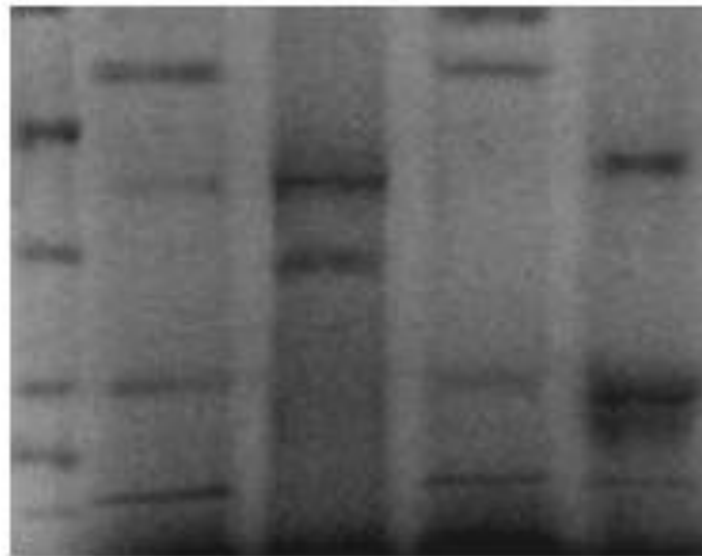


FIGURA 10 SDS-PAGE de Proteínas totales secretadas por *S. pneumoniae* en las distintas condiciones suplementadas con diferentes fuentes de hierro (hemoglobina, hemina y FeCl_3)

5.3. Cromatografía de afinidad

SDS-PAGE DE LAS PROTEÍNAS DEL CALDO DE CULTIVO PURIFICADAS CON HEMIN-AGAROSA EN CONDICIÓN CON HEMOGLOBINA

Como parte de los objetivos de la investigación se estableció la obtención de una proteína secretada por *S. pneumoniae* con actividad hemófora. Para dicho efecto se empleó el proceso de cromatografía de afinidad, el cual consiste en una matriz de perlas de agarosa que a su vez presentan en forma conjugada hemina; ligando que resultó de nuestro interés, ya que solo la proteína aislada fue aquella que tiene afinidad por la hemina (grupo prostético hemo).

La figura 9 representa un SDS-PAGE, del proceso de cromatografía de afinidad a hemina, en condición con 10uM de hemoglobina en donde se resalta una banda que representa la proteína candidato con capacidad de unión al grupo hemo en el carril 6. El presente gel tiene por objeto mostrar cada una de las fracciones colectadas durante la cromatografía de afinidad, en cada uno de sus pasos correspondientes, empezando con el carril 1 con el perfil de las proteínas secretadas totales en un total de 50 ug. de proteína. El carril 2 corresponde al perfil de aquellas proteínas que pese a que interactuaron con la matriz de hemin agarosa, no tuvieron la capacidad de unirse al ligando de hemina, (flow trough)

Por otra parte a partir del carril 3 al 5, se observa las fracciones colectadas de cada uno de los lavados a la matriz de hemin-agarosa con 500mM de NaCl,

con el fin de eliminar todas las uniones inespecíficas a la matriz hemin-agarosa.

Respecto a los carriles 6, 7 y 8 se demuestra las fracciones colectadas correspondientes al paso de elución, este paso tiene por objeto desprender bajo condiciones de alta fuerza iónica la(s) proteína(s) que tiene específicamente afinidad por el grupo hemo, de manera que al unirse a dicho ligando presente en la matriz se dio por sentado que dicha(s) proteína(s) tiene la capacidad de unir al grupo hemo, pero no se pudo confirmar en este punto la capacidad de la misma proteína de unir hemoglobina.

Por último contamos con el carril 10, en el que se observa la completa eliminación de todas la proteínas de la matriz hemin-agarosa.

En el caso particular sobre proteínas candidato de unión a hemina, es notorio que solo contamos con una sola proteína la cual es resaltada con un círculo en la figura 9. A partir de este momento dicha proteína será denominada como proteína candidato hasta el momento de conocer su identidad en ensayos posteriores.

Respecto a la proteína candidato, considerando los resultados de R.f de las proteínas de referencia junto con sus respectivos pesos moleculares (Marcador de pesos moleculares, carril M), y la relación lineal entre ellos pudimos estimar un peso molecular de 32.21 KDa para nuestra proteína candidato, resultados que se encuentran adjuntos en la tabla 7.

P.M.	logPM	Distancia mm
250	2.39794001	2
150	2.17609126	6
100	2	17
75	1.87506126	28
50	1.69897	48
37	1.56820172	68
25	1.39794001	97
20	1.30103	105

TABLA 7 Logaritmo de PM de las proteínas de referencia y distancia migrada por cada proteína en mm.

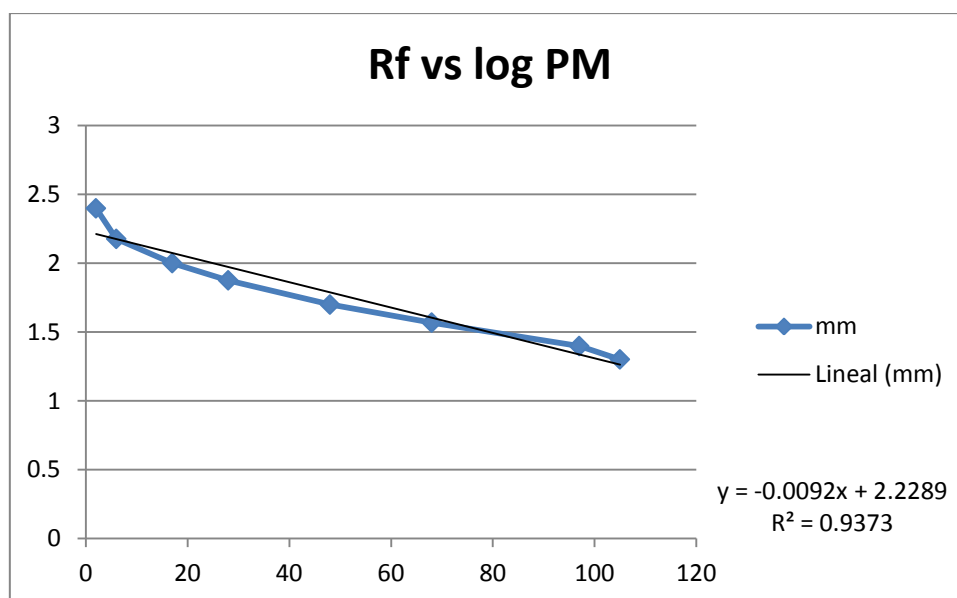


FIGURA 11. Regresión lineal Rf vs P.M. para el cálculo de pesos moleculares

Datos de la proteína candidato
$y = 1.508$
$x = 84 \text{ mm}$
$\log P.M. = 1.508$
$10^{1.508} = 32.21$
P.M. Proteína candidato = 32.21KDa

TABLA 8 Peso molecular estimado de la proteína candidato de unión a hemo.

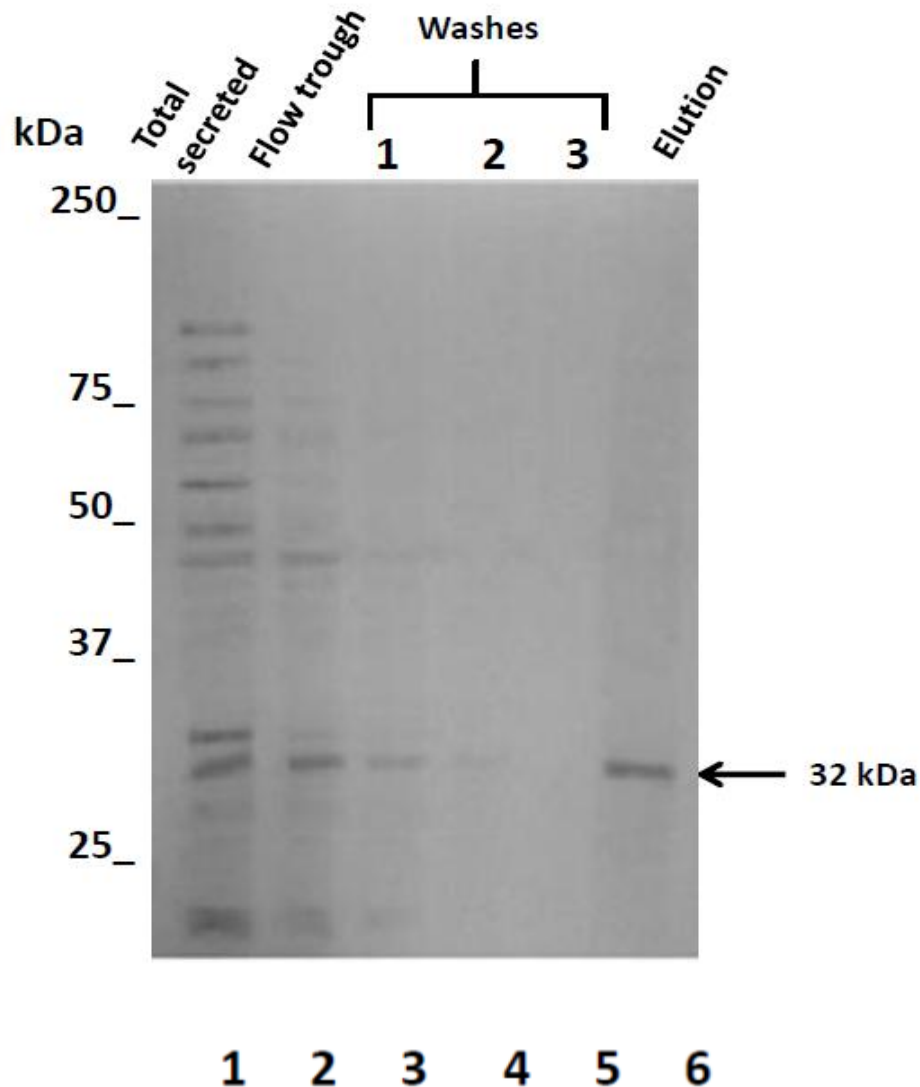


FIGURA 12 SDS-PAGE de las proteínas secretadas en condición con hemoglobina purificadas con Hemin-Agarosa: M, marcador de pesos moleculares, 1, Proteínas totales secretadas, 2, Flow trough, 3, Lavado 1, 4, Lavado 2, 5, Lavado 3, 6, Elución 1, 7, Elución 2, 8, Elución 3, 9, Perlas liberadas por completo de proteínas.

Con la intención de tener completa certeza y control del diseño del experimento fue requerido incluir un control, el cual consistió en someter exclusivamente el medio de cultivo ultraconcentrado con 10uM de Hemoglobina, tal como sería en la condición de estudio con hemoglobina, con la diferencia que dicho medio de cultivo se utilizó sin inocular. Este medio de cultivo también fue sometido de la misma manera que extracto total de proteínas secretadas por *S pneumoniae*, al proceso de cromatografía de afinidad, con el propósito de descartar que nuestra proteína candidato proviniera del medio de cultivo y no del microorganismo como se ha planteado anteriormente.

A continuación se presenta en la figura 10, el SDS-PAGE, del control del medio de cultivo, donde se observa claramente en los carriles correspondiente a las eluciones ninguna proteína de unión a hemina, ni tampoco alguna banda que coincidiera en los 32 KDa, que pudiera confundir el resultado de nuestra proteína candidato.

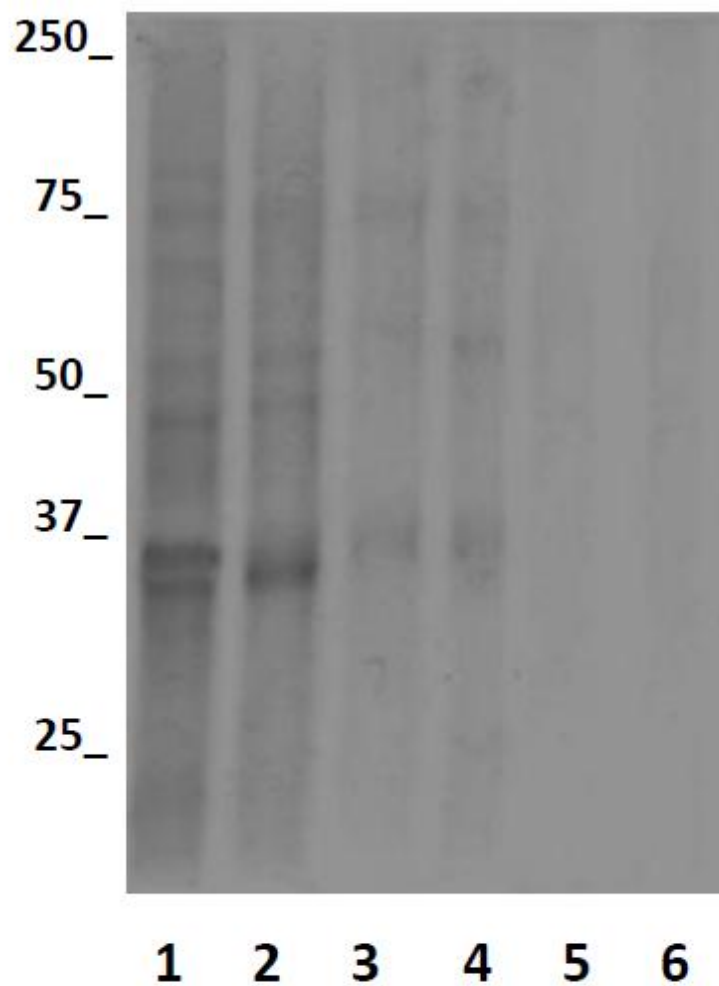


FIGURA 13 Control del proceso de purificación a través de la cromatografía de afinidad a hemina,

Medio de cultivo con hemoglobina a una concentración 10uM, sin inocular, con la intención de descartar el origen de la proteína candidato, que este no sea del medio de cultivo y sí sea una proteína secretada por parte de ***S. pneumoniae***.

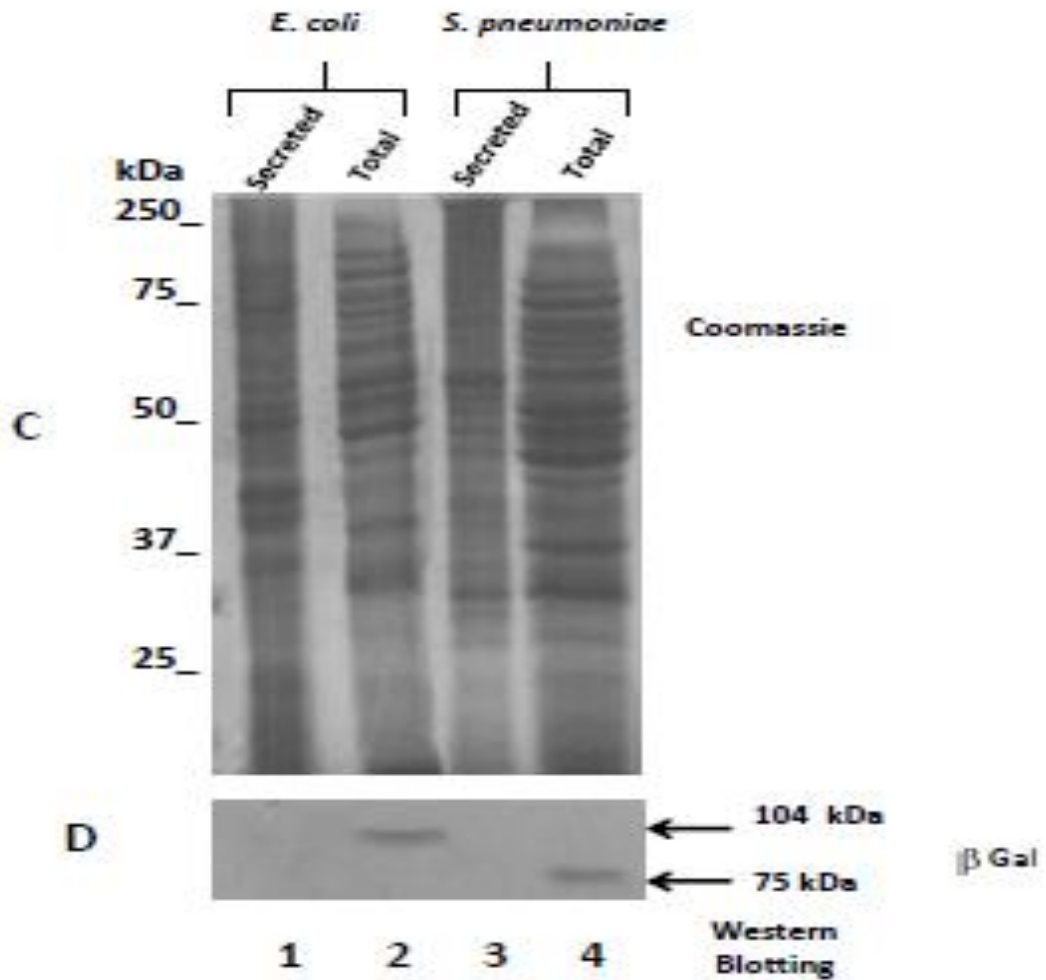


FIGURA 14 Control de lisis del proceso de purificación a través de la cromatografía de afinidad a hemina

C. Coomassie de las proteínas secretadas y totales de *E. coli* y *S. pneumoniae*.
 D Western blotting para la detección de beta-galactosidasa como proteína típica de citoplasma, misma que no debe encontrarse en la fracción de proteínas secretadas

5.4. Ensayo de Overlay de Unión a Hemoglobina

El ensayo de overlay de unión a hemoglobina tuvo por objeto demostrar que nuestra proteína candidato también tiene la capacidad de unir hemoglobina y no solo guarda afinidad por el grupo hemo. Tal y como se propuso en los objetivos particulares del presente proyecto de investigación.

En la figura 11A, se observa a la altura de 32 KDa, una señal producto de la quimiluminiscencia por la acción de la peroxidasa debido al reconocimiento del anticuerpo secundario, y este sobre el anticuerpo primario cuya función radica en la unión a la alfa-globina de la hemoglobina cuando esta se encuentra presente, misma que a su vez indica en nuestro caso particular que la hemoglobina fue unida por nuestra proteína candidato, al ser transferida a una membrana e hibridada a esta última con hemoglobina.

Refiriéndonos a la figura 11B, esta se trata del control negativo, es decir la membrana de nitrocelulosa no fue hibridada con hemoglobina. Sin embargo, la señal que se presenta alrededor de 35 KDa, se asume que se trató de nuestro control positivo, que consiste del medio de cultivo sin inocular y con una concentración de 10uM de hemoglobina.

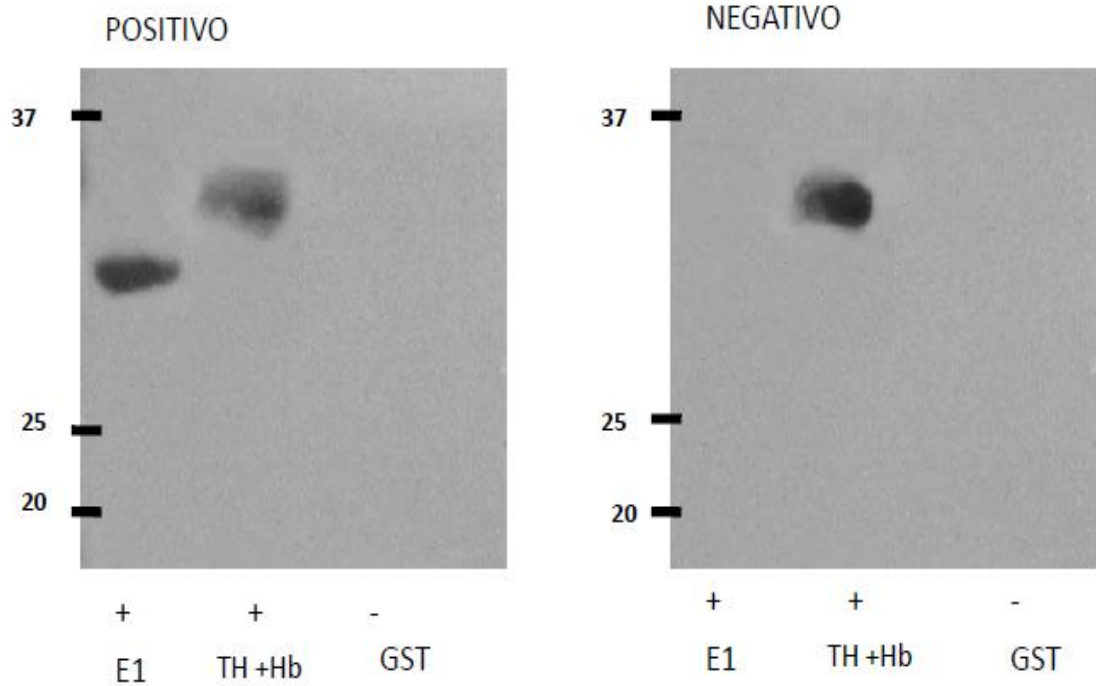


FIGURA 15A

FIGURA 15B

FIGURA 15 Ensayo Overlay de Unión a hemoglobina

La figura 11A demuestra la afinidad de la proteína candidato a hemoglobina. La figura 11B, control negativo, que no fue hibridado con hemoglobina. Sin embargo, se reveló la presencia de la hemoglobina en el medio de cultivo sin inocular y a una concentración de 10U_m.

5.5. Unión a hemoglobina en condiciones Nativas

Una vez confirmada la unión de hemoglobina por parte de la proteína candidato, procedimos a un segundo ensayo de unión, pero en esta ocasión, en condiciones nativas. Es decir, para este experimento fue necesario requerir de la proteína en condiciones nativas tanto como fuera posible, para así demostrar nuevamente que la proteína candidato puede unir hemoglobina.

El Native –PAGE, se fundamenta en que las proteínas en estado nativo pueden ser más compactas o laxas de manera que se ve afectada la capacidad que ellas tienen para migrar. También la necesidad de emplear Native-PAGE, es debido al requerimiento de visualizar la formación de complejos proteicos cuando hay atracción o afinidad entre dos proteínas. Por lo tanto si nuestra proteína candidato tiene capacidad de unir hemoglobina se verá un solo complejo que represente esa unión y que además cuente con una velocidad de migración diferente al de la proteína candidato y la hemoglobina.

En la figura 12 se observa un gel NATIVE-PAGE teñido con coomasie, el cual nos permitió confirmar que ciertamente la proteína candidato se une a la hemoglobina, esto es observable en el carril 3 que cuenta con la formación de un complejo cuya migración se ubica solo hasta el inicio del gel sumada una banda muy tenue que migró a la misma distancia que la hemoglobina sola, esto último nos sugiere que nuestra proteína candidato fue saturada por completo.

en su unión a hemoglobina, de manera que se presentó una fracción sin unir de hemoglobina.

Mientras que, en el carril1 se observa la migración de la proteína candidato en exclusiva, apreciándose que esta migró casi hasta el final del gel. En el carril 2 se observa la distancia migrada por la hemoglobina, notando que esta migró casi hasta la mitad del gel. El carril 4, cuenta con el control negativo en el cual se aprecia la no formación de complejos. El carril4 fue realizado con la previa interacción de la proteína candidato y 20uM de transferrina durante 30 minutos a 37°C, para posteriormente correr todos los carriles con las proteínas y/o controles de interés al mismo instante.

Por tal dado que no hubo afinidad con nuestra proteína candidato y la transferrina, en el carril 4 es visible la presencia de dos bandas una a la misma distancia de la proteína candidato, y otra que se trata de la transferrina, que difiere en cuanto a distancia migrada con respecto al resto de las proteínas antes mencionadas.

Por último en el carril 5 se contó solo con la migración de la transferrina la cual coincide en distancia con la banda del carril anterior.

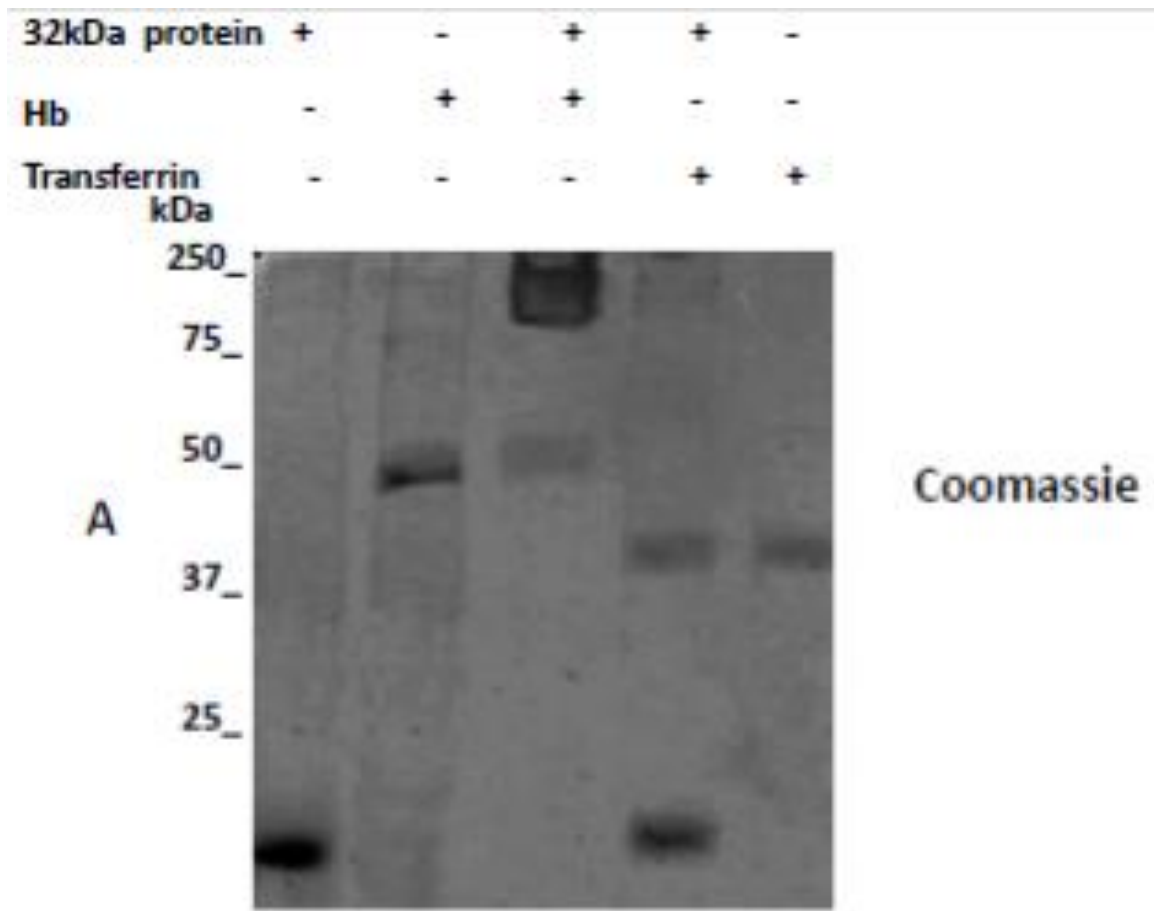


FIGURA 16 Native-PAGE:

Carril 1, proteína candidato. Carril 2, hemoglobina. Carril 3, complejo hemoglobina-proteína candidato. Carril4, control negativo transferrina superior y proteína candidato inferior. Carril 5, transferrina.

El ensayo anterior sirvió para demostrar la ubicación y la distancia migrada por cada uno de las proteínas en estudio. Sin embargo, no resulta suficiente dicho ensayo para evidenciar la presencia de hierro en las dos metaloproteínas (hemoglobina y transferrina), para dicho propósito fue necesario realizar la misma técnica de Native-PAGE, con la diferencia del revelado, el cual consistió en emplear una disolución de peróxido de hidrógeno al 3.5%, el cual tiene la

propiedad de oxidar al hierro y con esto evidenciar su presencia con la aparición de pequeñas bandas sepia durante unos pocos minutos. Por lo tanto en la figura 17 se muestra también un Native-PAGE, que se encontró constituido por los mismos elementos del ensayo anterior, solo que este último fue revelado con el peróxido de hidrógeno, razón por la que no se ubican las bandas correspondientes a la proteína candidato, ya que esta no posee hierro en su estructura química.

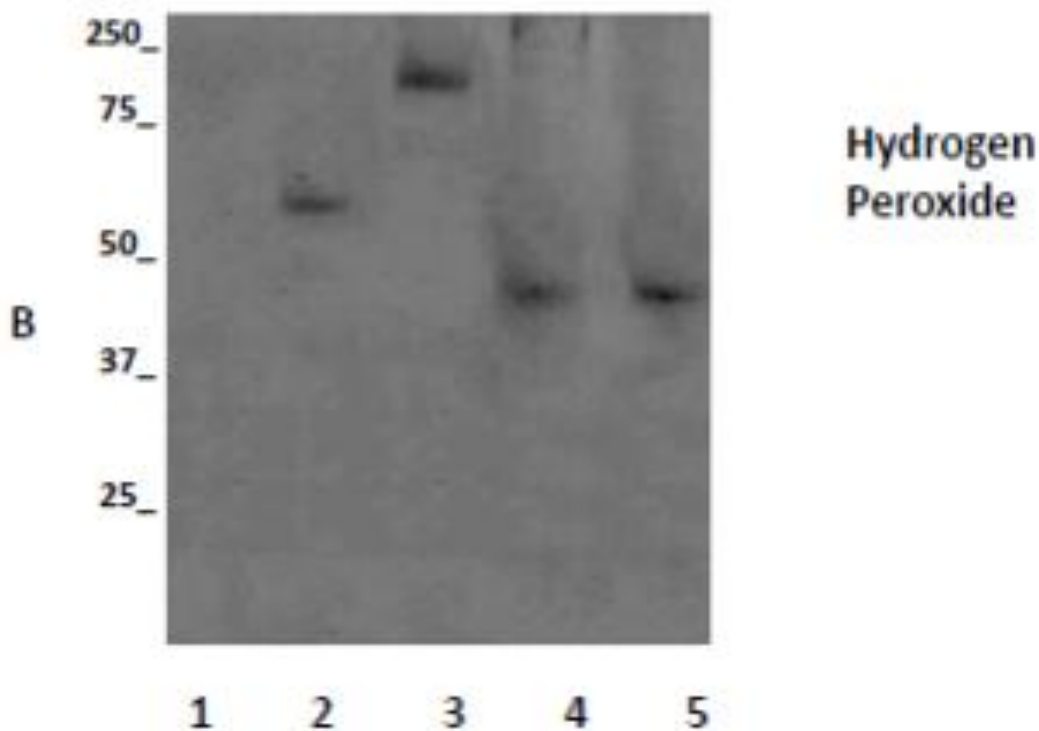


FIGURA 17 Native-PAGE:

Carril 1, proteína candidato. Carril 2, hemoglobina. Carril 3, complejo hemoglobina-proteína candidato. Carril4, control negativo transferrina superior y proteína candidato inferior.

5.6. Competencia con Hb, Hemina y Transferrina en gel de SDS-PAGE

El ensayo de competencia fue realizado con la finalidad de determinar con cual de las fuentes de hierro nuestra proteína candidato podría mostrar mayor afinidad, e inferir de cierta manera si dicha afinidad se puede deber al grupo prostético hemo, a las globinas sumadas al grupo hemo, o simplemente al elemento hierro. Por tal se realizó el proceso de cromatografía de afinidad, realizado en el punto 5.3, con la diferencia del paso de elución, el cual fue realizado con una solución 100 mM de Hb, 100mM, de hemina y 100mM de transferrina. Empleando para este ensayo al clorhidrato de guanidina 6M como control positivo ya que este en ensayos anteriores mostró eluir con efectividad a nuestra proteína candidato.

La figura 14 muestra en el carril 1 al control positivo, en el carril 2 se presenta a la hemoglobina 100mM como eluyente, tomando en cuenta que esta fracción fue la segunda en donde se recuperó la mayor proporción de la proteína candidato, en el carril 3 se muestra el eluyente de 100mM de hemina, siendo esta la tercera fracción y por último el carril 4 representa la elución con 100mM de transferrina, este carril fue cargado con la quinta fracción eluída, sin mostrar ningún éxito, puesto como es de apreciarse, es evidente la ausencia de la proteína candidato.

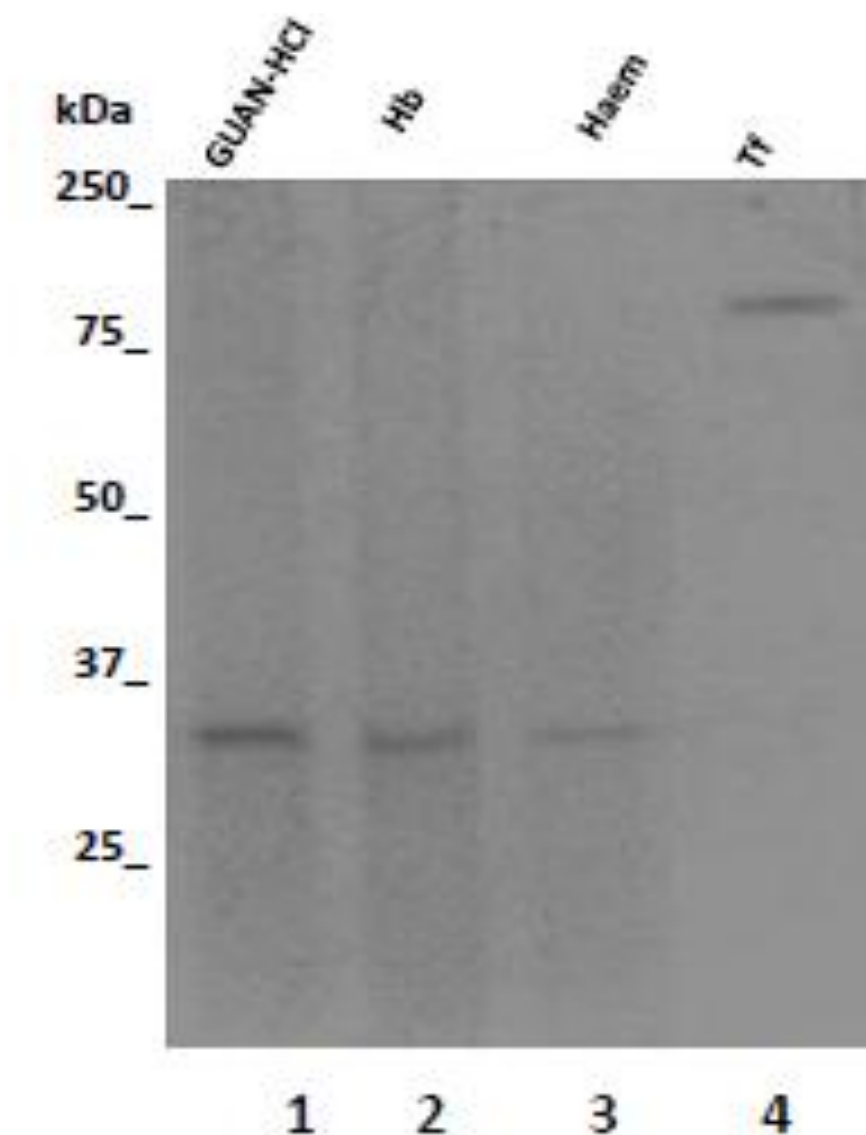


FIGURA 18 Competencia con Hemoglobina, hemina y transferrina:

Carril1, Clorhidrato de Guanidina 6M, carril 2, hemoglobina 100mM, carril 3 hemina 100Mm,carril 4, Transferrina 100Mm.

5.7. Identidad de la proteína candidato a través de Espectrometría de Masas

Una vez realizados los ensayos correspondientes hasta el punto 5.7, fue necesario recurrir a la técnica de espectrometría de masas tipo IS-LC/MS para revelar la identidad de la proteína candidato, empleando para esto la base de datos Matrix Science de MASCOT.

El análisis fue realizado en los laboratorios Protein Core Facility, de “Columbia University College of Physicians & Surgeons”, Nueva York, EUA.

Los resultados proporcionados por el laboratorio fueron los siguientes:

Proteína con 336 aminoácidos

Secuencia:

Cobertura en la secuencia de la proteína: 27%

Péptidos coincidentes mostrados **en rojo**.

1	MVVK VGINGF	GR IGRLAFRR	IQN VEGVEVT	RINDLTDPNM	LAHLLKYDTT
51	QGRFDGTV EV	K EGGFEVNGN	FIKVSAERDP	ENIDWATDGV	EIVLEATGFF
101	AKKEAAEKPL	HANGAK KVVI	TAPGGNDVKQ	LFSTLTTSIL	DGTETVISGA
151	SCTTNCLAPM	AKALHDAFGI	QKGLMTTIHA	YTGDQMIVDG	HRGGGDLRRA
201	RAGAANIVPN	STGARK AIGL	VIPELNGK LD	GAAQRVPVPT	GSVTELVVTL
251	DK NVSVDEIN	AAMK AASNDS	FGYTEDPIVS	SDIVGVSYGS	LFDATQTKVM
301	EVDGSQLVKV	VSWYDNEMSY	TAQLVR TLEY	FAK IAK	

Posible proteína:

Gliceraldehído tres fosfato deshidrogenasa GAPDH

PROPIEDADES

Para complementar la identidad y las propiedades bioquímicas de la proteína candidato, se obtuvieron los siguientes resultados del análisis bioinformático, empleando como fuente de consulta los siguientes sitios:

- **ProtParam**
- **PROSITE**

Number of amino acids: 336

Molecular weight: 32870.7

Theoretical pI: 5.38

Amino acid composition:

Ala (A)	33	9.8%
Arg (R)	14	4.2%
Asn (N)	17	5.1%
Asp (D)	22	6.5%
Cys (C)	2	0.6%
Gln (Q)	9	2.7%
Glu (E)	19	5.7%
Gly (G)	34	10.1%
His (H)	5	1.5%
Ile (I)	20	6.0%
Leu (L)	23	6.8%
Lys (K)	20	6.0%
Met (M)	8	2.4%
Phe (F)	12	3.6%
Pro (P)	10	3.0%
Ser (S)	17	5.1%
Thr (T)	27	8.0%
Trp (W)	2	0.6%
Tyr (Y)	7	2.1%
Val (V)	35	10.4%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%



ScanProsite Results Viewer

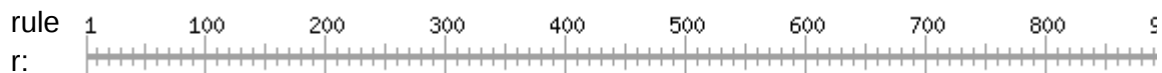
This view shows ScanProsite results together with ProRule-based predicted intra-domain features ([help](#)).

Hits for all PROSITE (release 20.81) motifs on sequence USERSEQ1 :

found: 1 hit in 1 sequence

USERSEQ1 (336 aa)

MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVETRINDLTPNMLAHLLKYDTTQGR
FDGTVEVKEGGFE
VNGNFIKVSAERDPENIDWATDGEIVLEATGFFAKKEAAEKPLHANGAKKVVI
TAPGGNDVKQLF
STLTTSLDGTETVISG **ASCTTNCL**APMAKALHDAFGIQKGLMTTIHAYTGDQM
IVDGHRRGGGDLR
RARAGAANIVPNSTGARKAIGLVIPELNGKLDGAAQRVPVPTGSVTELVTLD
KNVSVDEINAAMK
AASNDSFGYTEDPIVSSDIVGVSYSGLFDATQTKVMEVDGSQLVKVVSWYDN
EMSYTAQLVRTLEY
FAKIAK



hits by patterns: [1 hit (by 1 pattern) on 1 sequence]

Hits by [PS00071](#) **GAPDH** *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase active site* :

USERSEQ1



(336 aa)

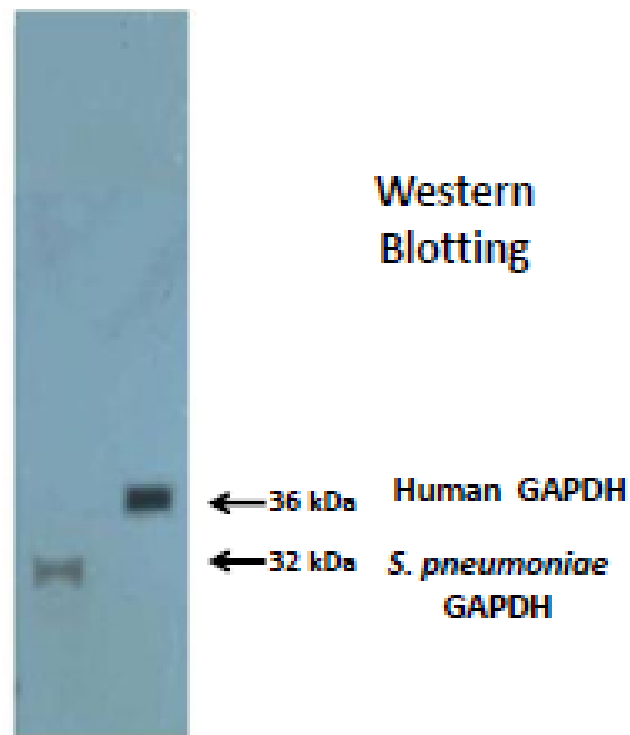


FIGURA 19 Western Blot para detección de GAPDH:

La figura 19 muestra la confirmación de la identidad de la proteína de 32 KDa, como gliceraldehído tres fosfato deshidrogenasa.

6.0. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La evaluación del crecimiento (Fig 1 de *S. pneumoniae* **R6**, en diferentes fuentes exclusivas de hierro, tales como la hemina hemoglobina y cloruro de hierro III tuvo por objeto demostrar que el microorganismo fue capaz de proliferar con exclusivamente las fuentes de hierro antes mencionadas. Sin nunca pretender ejemplificar una curva de crecimiento con las fases tradicionales, que esto implica tales como; adaptación, exponencial, estacionaria y muerte. Es por tanto, que solo nos limitamos hasta un monitoreo de 7 horas.

A su vez pudimos confirmar el restablecimiento del crecimiento en la cepa R6, cuando al medio de cultivo (T-H) fue suplementado con 10uM de la fuente de hierro en estudio.

Al igual que Gupta y col. 2009, confirmamos que R6 crece en condición con hemoglobina, hemina y sales de hierro.

Al confirmar el crecimiento anterior, sumado a la información de tiempo y D.O. arrojado por el monitoreo del crecimiento en un lapso de 7 horas, se optó por tomar como referencia a la hora 7, con una D.O. promedio de 0.82 (Figura 7) para la condición con hemoglobina, como el momento ideal para detener el crecimiento y separar el botón celular del medio de cultivo que contenía las proteínas secretadas. Ya que en ensayos previos, realizados por Olivares y col, 2008, se demostró que la actividad proteolítica de las enzimas producidas por R6, seguida de una etapa de autólisis celular, inicia comúnmente cuando la D.O. es por arriba a 0.9.

A partir de este momento, para los ensayos posteriores nos enfocaremos exclusivamente en la condición con hemoglobina 10uM, ya que la probabilidad de aislar alguna proteína con posible actividad de unión a hemoglobina es más factible que se encuentre cuando la hemoglobina está presente en el medio de cultivo, como única fuente de hierro (Wandersman y Delepelaire., 2004).

Acorde con estudios semejantes a los nuestros, realizados por Battistoni y col. en el año 2002, se sugirió el uso de una resina de Hemin-Agarosa, para aislar de un extracto proteico alguna proteína con capacidad de unión a hemina. De igual manera, este método fue implementado por Tsutsui y Müller en 1981,

para el aislamiento de proteínas de unión a hemina, provenientes de suero de conejo.

Contando con ambos antecedentes, se justificó el empleo de una resina de hemin-agarosa para el proceso de cromatografía de afinidad a hemina. Sin embargo, fueron requeridas incluir algunas adecuaciones a las técnicas antes sugeridas, para eficientar el proceso de lavados y de eluciones en lo que concierne a nuestra investigación, como por ejemplo incrementar la Molaridad en la disolución de lavado, o el empleo de clorhidrato de guanidina para las eluciones.

En concreto, en lo que respecta directamente a la cromatografía de afinidad a hemina, (figura 9), la banda representativa a la proteína candidato de unión a hemoglobina ubicada en los 32 KDa, no se obtuvo por igual en ninguna de las fracciones correspondientes a los lavados y a las eluciones del control (Figura 10). De este modo podemos asumir que la proteína candidato no fue producto del medio de cultivo donde se inoculó a la cepa R6, sino que fue sintetizada por ***S. pneumoniae* R6**.

El ensayo de Overlay (Figura 11), sugerido por investigaciones anteriores que buscaron también interacciones proteína-hemoglobina, como la de González y

col. 2008, fue el primer indicio que se obtuvo con respecto a la capacidad de la proteína candidato de unir particularmente hemoglobina, incluso en condiciones desnaturalizantes. Igualmente el ensayo se validó a través del control negativo, que pese a que este no fue hibridado con hemoglobina, se confirmó la efectividad de los anticuerpos, gracias a la clara detección de la hemoglobina presente en el control positivo tanto de la membrana hibridada, como en la no hibridada.

Entonces, si la proteína candidato tuvo la capacidad de unir a la hemoglobina en el ensayo de overlay, es de pensar que esta también debió teóricamente de unir a la hemoglobina en condiciones nativas. Para esto se realizó, el Native-PAGE, en el cual al igual que Silvy Létoffè y col. 1998, nos basamos en el concepto de la formación de complejos con diferente migración a la de cada uno de los elementos que componen al complejo. La figura 12 enfatiza la formación de un complejo en el carril 3 con una escasa migración. También que, con 40uM de hemoglobina fue suficiente para saturar la capacidad de unión de la proteína candidato, quedando un ligero remanente de hemoglobina.

Por otro lado, la cromatografía de afinidad (Figura 9), el ensayo de overlay (Figura 11) y el Native-PAGE (Figura 12), sugieren la probabilidad, que la unión entre la proteína candidato y la hemoglobina haya sido por un reconocimiento o

interacción inmediata con el grupo prostético hemo, y no por un reconocimiento de las globinas (monómeros proteicos tipo alfa y beta de la hemoglobina). Esta idea surgió del resultado obtenido en el control negativo del ensayo de Native-PAGE, (Figura 12, carril 4), en el cual se aprecia que no existió la formación de un complejo, sumado al hecho de considerarse, que la transferrina es una metaloproteína rica en átomos de hierro, pero que carece de grupo prostético, es decir el hierro se encuentra asociado a esta proteína sin la necesidad de un grupo o estructura química no aminoacídica como el grupo hemo de la hemoglobina

Esta hipótesis es apoyada por estudios anteriores realizados por Buisson y col., 2009, quienes propusieron un modelo en ***Bacillus cereus*** que explica la interacción/unión de una proteína (BCR4442) y la hemoglobina, donde el grupo hidroxilo (OH) de la treonina 132 de la proteína genera un puente de hidrógeno o momento dipolar con el nitrógeno presente en el grupo hemo, favoreciendo la liberación del grupo hemo.

Además de demostrar la unión de la proteína candidato con la hemoglobina en condiciones desnaturalizantes y nativas. Surgió el interés de someterla a un ensayo de competencia, bajo la siguiente premisa: Si la proteína candidato fue capaz de unirse a la hemina, de unir hemoglobina hasta la formación de un complejo, pero no de unir transferrina, entonces la proteína candidato puede

ser eluída de la matriz de hemin-agarosa, por hemina, hemoglobina, pero no por transferrina.

La figura 13, representa la competencia entre la matriz hemin- agarosa con los sustratos con los que muestra afinidad la proteína candidato, es decir se demostró que al ser afín la proteína candidato con la hemina y la hemoglobina, la proteína candidato pudo ser desprendida de la matriz hemin-agarosa. No obstante, con respecto a la transferrina, esta última no desprendió de la matriz a la proteína candidato.

Cabe mencionar, que de un total de cinco eluciones con cada uno de los eluyentes mencionados (hemina, hemoglobina y transferrina), con la hemoglobina en la fracción 2 se obtuvo la mayor proporción de la proteína candidato, mientras que para el caso de la elución con hemina la fracción 4 fue la mayoritaria, y por último de la fracción 1 a 5 no se presentó la banda estimada en 32KDa, característica de la proteína candidato. Esto se puede explicar, debido a que la hemoglobina cuenta con cuatro grupos hemo por cada molécula, mientras que la hemina contiene un solo grupo hemo por cada molécula.

Finalmente como punto esencial del proyecto de investigación se planteó la identificación de la proteína candidato, a través de espectrometría de masas. Como ya se mostró en los resultados, la identificación con el 27% de cobertura de la proteína candidato, fue suficiente para cubrir semejanza en cuanto la secuencia de amino ácidos con la enzima Gliceraldehído tres fosfato deshidrogenasa (GAPDH), de ***Streptococcus agalactiae***, con talla molecular conocida de 35KDa, según el software de búsqueda MASCOT,

No obstante, dos opciones más fueron proporcionadas por el laboratorio de espectrometría:

1. Enolasa de ***S. pneumoniae*** con 59% de cobertura y talla molecular de 47 KDa.
2. Factor de enlongación Ku de ***S. pyogenes*** con 18% de cobertura y talla de 72 KDa.

Por tal, tomando en cuenta las dos opciones anteriores, es que se optó por creer que la proteína que mejor coincide para descifrar la identidad de la proteína candidato es la gliceraldehído tres fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

También después de realizar una búsqueda bioinformática en el sitio de ProtParam, calculamos una talla molecular de 32. 870 KDa, con un porcentaje

de predominio de treonina (8%), glicina (10%), valina (10.4%) y alanina (9.8%).

Del sitio PROSITE, obtuvimos como información adicional para nuestra proteína candidato, la ubicación del posible sitio activo (centro catalítico) característico de la GAPDH, el cual está constituido del aminoácido 150 al 157, por la secuencia ASCTTNCL. Con estas razones nos fue suficiente para asumir que la proteína candidato es una GAPDH.

Si bien, ya contamos con información adicional para reconocer la identidad de la proteína candidato; Pero cómo se explica que una enzima clásica del metabolismo de azúcares, necesaria para la glucólisis, y ubicada típicamente en el citoplasma de cualquier célula, es secretada por ***Streptococcus pneumoniae*** R6 para unir hemoglobina? Actualmente algunos autores como Henderson y Martin han discutido sobre esta controversia en una revisión del 2009, titulado: “**Bacterial Virulence in the Moonlight: Multitasking Bacterial Moonlighting Proteins Are Virulence Determinants in Infectious Disease**” en donde expusieron la multifuncionalidad de proteínas reconocidas por una función particular, a manera que han servido de modelos clásicos de estudio para la bioquímica general.

Igualmente Pancholi y Fischetti en 1992, demostraron que la GAPDH de ***S. pyogenes***, además de servir para transformar al gliceraldehído tres fosfato en 1,2 difosfoglicerato en la glucólisis, también tiene la capacidad de unir

fibronectina, lisozima y proteínas del citoesqueleto, para favorecer la colonización.

Adicional a esta información, en los estudios de Krishnamurthy y col., 2004, realizados en *Leishmania* demostraron que la enzima hexoquinasa localizada en la membrana del pocket flagelar del microorganismo, une hemoglobina, además de realizar su ya conocida función como transferasa de grupos fosfato en la glucólisis.

Finalmente, Jin y col., 2009, confirmaron al igual que Fischetti y Pancholi que la GAPDH, de ***S. pyogenes***, une fibronectina, actina y miosina, y que a su vez la GAPDH, no solo se encontró en citoplasma, y membrana celular, también fue localizada en el medio extracelular, lo cual indica que la GAPDH, puede ser secretada por algunos microorganismos, según sean las necesidades.

7.0. CONCLUSIONES

- La proteína candidato tiene una talla molecular aproximado de 32 kDa.
- La proteína candidato tiene la capacidad de unir hemoglobina en Native- PAGE.
- La proteína candidato demuestra afinidad por hemina y Hb, pero no por transferrina.
- La proteína candidato guarda mayor identidad con la GPDH. A partir del a.a. 152-157, la secuencia es semejante a la del sitio activo de la GPDH.

REFERENCIAS

1. Alberts, B et al. (1996) *Biología Molecular de la Célula*. 3ra Edición. Ediciones Omega S.A.Barcelona.
2. Asuthkar S (2007) Expression and characterization of an iron-regulated hemin-binding protein, HbpA, from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect. Immun.* 75, 4582-4591
3. Battistoni F, Platero, Duran R (2002) Identification of an Iron-Regulated, Hemin-Binding Outer Membrane Protein in *Sinorhizobium meliloti*. . *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5877 – 5881.
4. Benton, K., J. Paton, and D. Briles. 1997. Differences in virulence for mice among *Streptococcus pneumoniae* strains of capsular types 2, 3, 4, 5, and 6 are not attributable to differences in pneumolysin production. ***Infect. Immun.*** 65:1237-1244.
5. Brown J.S. Gilliland S M, Holden D W (2001). A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol Microbiol*, 40(3): 572-585.
6. Brown JS, Gilliland SM, Holden DW. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. ***Mol Microbiol*** 2001;40:572–85.
7. Brown JS; Gilliland SM; Ruiz-Albert J; Holden DW. (Aug 2002). Characterization of pit, a *Streptococcus pneumoniae* iron uptake ABC transporter. ***Infect Immun.*** 70: 4389-4398.
8. Dave, S., M. K. Pangburn, C. Pruitt, and L. S. McDaniel. 2004. Interaction of human factor H with PspC of *Streptococcus pneumoniae*. ***Indian J. Med. Res.*** 119(Suppl.):66–73.
9. Davies J, Carlstedt I, Nilsson AK, Håkansson A, Sabharwal H, van Alphen L, van Ham M, Svanborg C. Binding of *Haemophilus influenzae* to purified mucins from the human respiratory tract ***Infect. Immun*** 1995 Jul; 63(7):2485–2492.
10. Especificaciones de base de agar sangre, MCD LAB S.A. de C.V., 2011-07-15
11. Genco, C. A. and Dixon, D. W. (2001) Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol.* 39, 1-11.

12. Gillespie SH, Ullman C, Smith MD, Emery V (1994) Detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples by PCR. **J Clin Microbiol**, 32, 1308-131
13. González-López M.A., Olivares-Trejo J.J. (2009). The gene *frpB2* of *Helicobacter pylori* encodes an hemoglobin-binding protein involved in iron acquisition. *Biometals*. 22, 889-94.
14. Gupta R. Shah P, Swiatlo E, (2009). Differential gene expression in *Streptococcus pneumoniae* in response to various iron sources. *Microbial Pathogenesis* 47 101–109.
15. Hakansson A, Roche H, Mirza S, McDaniel LS, Brooks-Walter A, et al. (2001). Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A **Infect Immun**. 62: 2707-2714
16. Horton, R. H. et al. Principles of Biochemistry, 3rd ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2002.
17. Ingraham, John y Caroline Ingraham. **Introduction to Microbiology**, 2nd ed. 2000 Pacific Grove, CA.
18. José Alfredo Badager Lozano y colaboradores, Guía de Práctica Clínica: Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de Neumonía. 2009, IMSS.
19. López-Casamichana, M., Orozco, E., Marchat, L.A. and López-Camarillo C. (2008) Transcriptional profile of the homologous recombination machinery and characterization of the EhRAD51 recombinase to DNA damage in *Entamoeba histolytica*. *BMC Mol Biol* 9. 35
20. Nair S, Finkel SE: Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. **J Bacteriol** 2004 , 186:4192-4198.
21. Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. and Krieg, N.R, 1999 “**Microbiology Concepts and Applications**”, 6th ed., McGraw-Hill Inc., New York, U.S.A. pp. 478-479
22. Prado J, Rev. chil. infectol. v.18 s.1 Santiago 2001
23. Pramanik A, Braun V. Albomycin uptake via a ferric hydroxamate transport system of *Streptococcus pneumoniae* R6. **J Bacteriol** 2006;188:3878–86.
24. R. Gupta , P. Shah , E. Swiatlo, (2009). Differential gene expression in *Streptococcus pneumoniae* in response to various iron sources. **Microbial Pathogenesis** 47 :101–109.
25. Ratledge C, Dover LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria *Annua Rev Microbiol*, 54: 881-941.
26. Revista Cubana de Hematología 2000.

27. Rossi, M. S., Fatherston, J. D., Letoffe, S., Carniel, E., Perry, R.D. and Ghingo, J. M. (2001) Identification and characterization of the hemophore – dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 69: 6707-6717
28. Rudolph, K. M., A. J. Parkinson, C. M. Black, and L. W. Mayer. 1993. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. **J Clin Microbiol** 1993;31:2661
29. Ruiguang GE, Xuesong SUN, Qingyu HE. (2009) Iron acquisition by *Streptococcus* species: An updated review. *Front. Biol China* 4(4) 392-401.
30. Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). ***Sherris Medical Microbiology 4to.*** ed.. McGraw Hill.
31. Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Peterson S, et al. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. ***Science*** 2001;293:498–506.
32. Todd, E. W. y L.F. Hewitt, 1932. A new culture medium for the production of antigenic streptococcal haemolysin. ***J. Pathol. Bacteriol.*** 35: 973-975.
33. Tu, A.-H., R. L. Fulgham, M. A. McCrory, D. E. Briles, and A. J. Szalai. 1999. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. ***Infect. Immun.*** 67:4720–4724.
34. Van Damm, J. E. G., A. Fleer, and H. Snippe. 1990. **Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides.** *Antonie Leeuwenhoek* 58:1–17.
35. Waite R.D. et al., 2003 Spontaneous sequence duplications within capsule genes *cap 8E* and *tts* control phase variations in *Streptococcus pneumoniae* serotypes 8 and 37. ***Microbiology*** 149: 497-504.

1.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 20 de enero Septiembre del 2012, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Q.A. Zelene Edith Vázquez Zamorano

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Dra. Mavil López Casamichana

Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda

M. en C. Fernando Vargas Romero
